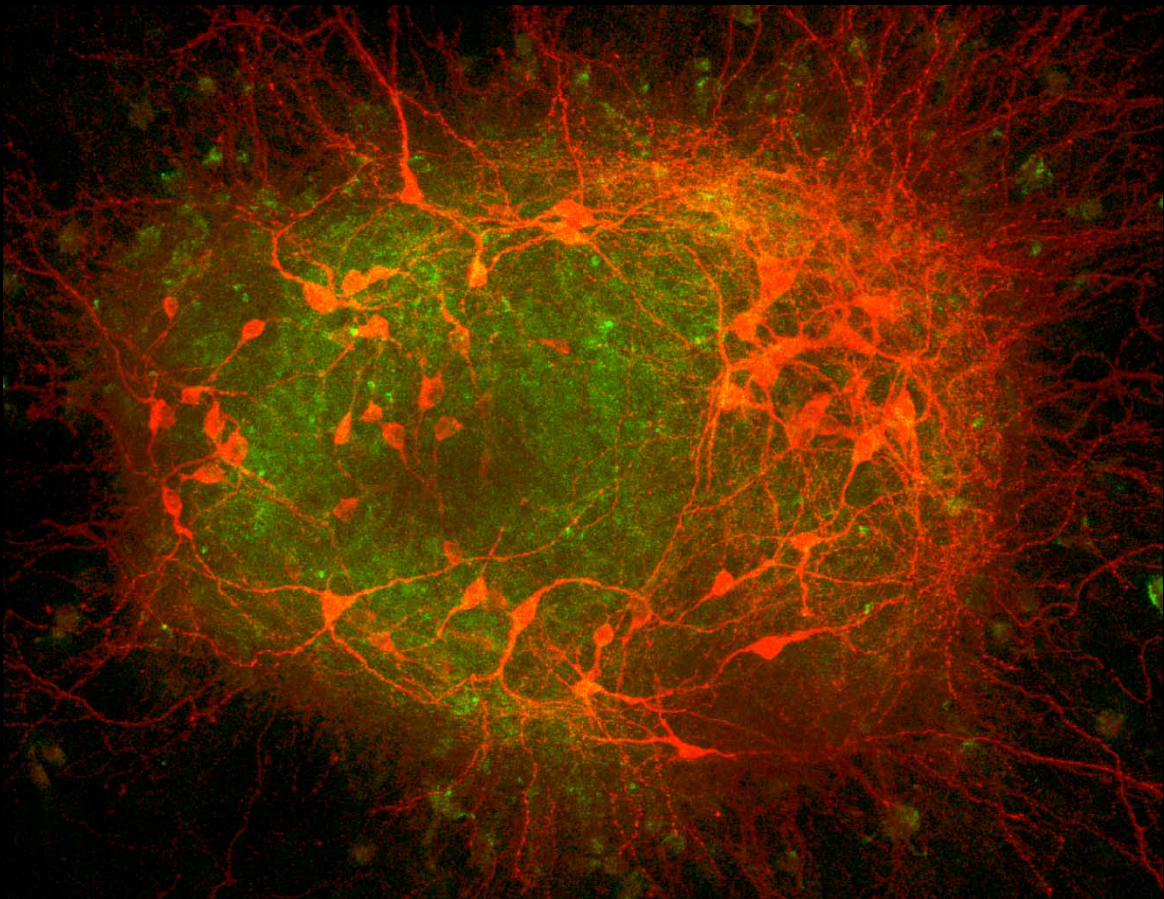


**Generación de neuronas dopaminérgicas a partir de
células madre neurales mesencefálicas.
Nuevas contribuciones al desarrollo de terapia celular para la
enfermedad de Parkinson.**



Tesis doctoral
Juan Andrés Parga Martín
2009

Universidade de Santiago de Compostela

Facultade de Medicina

Departamento de Ciencias Morfolóxicas

Generación de neuronas dopaminérgicas a partir de células madre neurales mesencefálicas.

Nuevas contribuciones al desarrollo de terapia celular para la enfermedad de Parkinson.

Tesis doctoral

Juan Andrés Parga Martín

2008

Generación de neuronas dopaminérgicas a partir de células madre
neurales mesencefálicas. Nuevas contribuciones al desarrollo de
terapia celular para la enfermedad de Parkinson.

Tesis doctoral presentada por

Juan Andrés Parga Martín

Directores:

José Luis Labandeira García

Catedrático de Anatomía Humana

Jannette Rodríguez Pallares

Profesora Contratada Doctora

Departamento de Ciencias Morfológicas

Facultade de Medicina

Universidade de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, 2008

Fotografía de portada: Imagen de una neurosfera donde se pueden observar células dopaminérgicas (rojo) alrededor de un núcleo central de células de la placa basal (verde) tomada mediante microscopía láser confocal. 400x

D. José Luis Labandeira García, Catedrático de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y **Dña. Jannette Rodríguez Pallares**, Profesora Contratada Doctora de la misma Universidad,

HACEN CONSTAR QUE:

D. Juan Andrés Parga Martín ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral *Generación de neuronas dopaminérgicas a partir de células madre neurales mesencefálicas. Nuevas contribuciones al desarrollo de terapia celular para la enfermedad de Parkinson*, y que dicho trabajo reúne todas las condiciones necesarias para ser presentado para su valoración por la comisión correspondiente.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firmamos en Santiago a 1 de Septiembre de 2008

José Luis Labandeira García
Catedrático de Anatomía Humana
Dpto. CC. Morfológicas

Jannette Rodríguez Pallares
Profesora Contratada Doctora
Dpto. CC. Morfológicas

Juan Andrés Parga Martín

God has placed no limits to the exercise of the intellect he has given us, on this side of the grave.

FRANCIS BACON

Science, at bottom, is really anti-intellectual. It always distrusts pure reason, and demands the production of objective fact.

HENRY LOUIS MENCKEN

A mis seres queridos, no sabeis lo mucho que os debo.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a aquellos que permitieron que esta tesis fuera posible, en especial a:

José Luis Labandeira García, por haberme aceptado en su laboratorio y darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación, porque sin su trabajo e ilusión esta tesis no hubiera sido posible.

Jannette Rodríguez Pallares, por todo lo que me enseñó, y porque a su manera sigue formándome.

María Josefa Guerra Seijas, por su acogida, por estar siempre dispuesta a ayudar y sacrificarse por los demás, por permitirme aprender a enseñar a su lado.

Ana López, que tanto me ayudó y me enseñó en mis primeros tiempos en el laboratorio, por todo el apoyo que me dio.

Ana Muñoz por su amabilidad y ayuda, por ser siempre tan cordial.

Pablo, por sus enseñanzas, porque en tantos momentos me sacó de apuros que sin su conocimiento y habilidad hubieran sido grandes problemas.

César, capaz de darme confianza en mi mismo sin la que esta tesis no hubiera sido posible.

Iria, por enseñarme cuando no sabía nada, que es siempre tan difícil y complicado.

Pili, ella me acompañó durante todos estos años, nunca lo suficientemente ocupada como para negarme su ayuda, parte de esta tesis es tan suya como mía.

Belén, por su amistad, por todos los buenos momentos que pasamos juntos, por todo el trabajo y el esfuerzo que realiza en el laboratorio sin que a menudo sea reconocido.

Ana Isabel, por mostrarme una nueva visión de la vida tan atractiva, por la ilusión, alegría y fuerza que transmite.

Begoña, Lucía y Rita, por todo lo que aportaron al laboratorio desde su llegada y por el enorme potencial que tienen, porque con ellas se abren nuevas posibilidades.

Jos, por su vitalidad y alegría.

Katia, Daniel, Ismael, Czesto, Vero, Teresa, y a todos los chicos de prácticas y en formación que pasaron durante este tiempo por el laboratorio, en especial a **Julia**, porque me ha permitido ver el laboratorio desde un nuevo punto de vista, motivándome más en mi formación.

Y a la gente que desde fuera del laboratorio me aguantaron durante este tiempo, a **mis padres, mis hermanos**, porque realmente todo esto no tendría sentido sin vosotros, y no hay mejor motivación que vosotros, a **Eva**, por la maravillosa vida que me muestra cada día, **Archi, Clavículas, Chisco, Gus, Capelo, Carlos, Diego, César**, y a todos los chicos que a través del rugby me emocionaron y formaron, en especial a **Raúl Varela**.

Espero no haberme olvidado de mencionar a ninguna de aquellas personas que influyeron de un modo notable o aportaron su esfuerzo para la preparación de esta Tesis Doctoral, y lamento no tener espacio suficiente para todos aquellos que consciente o inconscientemente permitieron su realización.

GENERACIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE NEURALES MESENCEFÁLICAS. NUEVAS CONTRIBUCIONES AL DESARROLLO DE TERAPIA CELULAR PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

INDICE

ANEXO.....	xv
PUBLICACIONES INCLUIDAS EN LA TESIS.....	xvii
PARTICIPACIÓN EN OTRAS PUBLICACIONES EN RELACIÓN AL TEMA DE LA TESIS DURANTE EL PERIODO DE DOCTORADO.....	xviii
ABREVIATURAS.....	xix
1- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1- ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	3
1.1.1- CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS, SINTOMATOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	3
1.1.2- PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	6
1.1.3- MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	11
1.1.4- TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	14
1.2- CÉLULAS TRONCALES / PROGENITORAS.....	23
1.2.1- CÉLULAS TRONCALES TOTIPOTENCIALES.....	24
1.2.2- CÉLULAS TRONCALES NEURALES.....	25
1.2.3- CÉLULAS TRONCALES NO NEURALES.....	26
1.2.4- PROGENITORES NEURALES <i>IN VIVO</i>	27
1.2.5- CÉLULAS TRONCALES OBTENIDAS ARTIFICIALMENTE.....	27
1.3- DESARROLLO DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS.....	33
1.3.1- ESPECIFICACIÓN REGIONAL.....	34
1.3.2- DIFERENCIACIÓN TEMPRANA.....	36
1.3.3- DIFERENCIACIÓN TARDÍA.....	36
1.4- MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS DE INTERÉS PARA ESTA TESIS.....	38
2- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	41
3- MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
3.1- AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PRECURSORES MESENCEFÁLICOS.....	49
3.2- ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS NEURONAL.....	50

3.3- AISLAMIENTO ARN Y RT-PCR.....	51
3.4- TRASPLANTES.....	51
3.4.1- LESIÓN 6-OHDA.....	51
3.4.2- PREPARACIÓN CELULAS MESENCEFÁLICAS Y TRASPLANTE.....	52
3.4.3- PRUEBAS COMPORTAMENTALES.....	52
3.5- INMUNOMARCAJE.....	52
3.5.1- MARCADORES EMPLEADOS.....	54
3.6- CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.....	57
4- RESULTADOS.....	59
4.1- La serotonina reduce la generación de neuronas dopaminérgicas a partir de precursores mesencefálicos a través de receptores de serotonina tipo 7 y tipo 4.....	61
4.2- Efecto del GABA y la inhibición de receptores de GABA en la diferenciación <i>in</i> <i>vitro</i> de precursores mesencefálicos a neuronas dopaminérgicas.....	77
4.3- La angiotensina II favorece la diferenciación de neuronas dopaminérgicas a partir de precursores mesencefálicos a través de receptores de angiotensina tipo 2.....	91
4.4- Efectos distintos de anticuerpos anti-Sonic hedgehog y el inhibidor de la ruta de hedgehog ciclopamina sobre la generación de neuronas dopaminérgicas a partir de neurosferas de precursores mesencefálicos.....	103
4.5- Precursores mesencefálicos proliferados forman implantes de neuronas dopaminérgicas densamente agrupadas que reinervan el estriado circundante e inducen respuestas funcionales en las neuronas estriatales.....	115
5- DISCUSIÓN.....	127
5.1- EFECTO DE LA SEROTONINA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.....	129
5.2- EFECTO DEL GABA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.....	133
5.3- EFECTO DE LA ANGIOTENSINA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.....	135
5.4- EFECTO DE SONIC HEDGEHOG SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.....	137
5.5- PRESENCIA DE LA SEÑAL EN EL CULTIVO.....	139
5.5.1- SEROTONINA.....	139
5.5.2- GABA.....	140
5.5.3- ANGIOTENSINA II.....	141

5.5.4- SONIC HEDGEHOG.....	141
5.6- POSIBLES MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN EMPLEADOS.....	142
5.6.1- SEROTONINA.....	142
5.6.2- GABA.....	143
5.6.3- ANGIOTENSINA II.....	144
5.6.4- SONIC HEDGEHOG.....	145
5.7- POBLACIONES NEURALES IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA.....	147
5.7.1- CÉLULAS GLIALES.....	147
5.7.2- OTRAS POBLACIONES NEURONALES: CÉLULAS SEROTONINÉRGICAS Y GABAÉRGICAS.....	150
5.8- PROCESOS ONTOGENÉTICOS INVOLUCRADOS EN LOS EFECTOS OBSERVADOS: PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y APOPTOSIS.....	153
5.8.1- SEROTONINA.....	154
5.8.2- GABA.....	154
5.8.3- ANGIOTENSINA II.....	155
5.8.4- SONIC HEDGEHOG.....	157
5.9- IMPLANTES DE PRECURSORES MESENCEFÁLICOS EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	159
6- CONCLUSIONES.....	165
7- BIBLIOGRAFÍA.....	169

ANEXO

1. Publicaciones incluidas en la Tesis

Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2004) Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci* 20:1489-1498.

Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2005) Expanded mesencephalic precursors develop into grafts of densely packed dopaminergic neurons that reinnervate the surrounding striatum and induce functional responses in the striatal neurons. *Synapse* 58:13-22.

Parga J, Rodriguez-Pallares J, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2006) Serotonin decreases generation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via serotonin type 7 and type 4 receptors. *J Neurobiol* 67:10-22.

Parga JA, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2007) Effects of GABA and GABA receptor inhibition on differentiation of mesencephalic precursors into dopaminergic neurons in vitro. *Developmental Neurobiology* 67:1549-1559.

Parga JA, Rodriguez-Pallares J, Blanco V, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2008) Different effects of anti-sonic hedgehog antibodies and the hedgehog pathway inhibitor cyclopamine on generation of dopaminergic neurons from neurospheres of mesencephalic precursors. *Dev Dyn* 237:909-917.

2. Participación en otras publicaciones en relación al tema de la Tesis durante el periodo de doctorado

Muñoz AM, Rey P, Parga J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2005) Glial overexpression of heme oxygenase-1: A histochemical marker for early stages of striatal damage. *J Chem Neuroanat* 29:113-126.

Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2007) Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem* 103:145-156.

Rodriguez-Pallares J, Rey P, Parga JA, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2008) Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiol Dis* 31:58-73.

3. Abreviaturas

5-HT	Serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptófano
5-HTT	Transportador de serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AC	Adenilato ciclasa
Ang	Angiotensina II
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BrdU	Bromodeoxiuridina
COMT	Catecolometiltransferasa
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
ECA	Enzima conversor de angiotensina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EP	Enfermedad de Parkinson
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GABA	Ácido γ -amino butírico
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
GAT	Transportador de ácido γ -amino butírico
GNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GP	Globo pálido
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
Hip	Proteína de interacción con Hedgehog
L-DOPA	3,4-dihidroxi-L-fenilalanina
MAO	Monoaminooxidasa
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenin-dinucleótido
NM	Neuromelanina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NT	Neurotransmisor
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
Ptc	Patched
RAS	Sistema renina-angiotensina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
SN	Substancia nigra
SNpc	Substancia nigra pars compacta
SNpr	Substancia nigra pars reticulada
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TH	Tirosina hidroxilasa
TpH	Triptófano hidroxilasa
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VIAT	Transportador vesicular de aminoácidos inhibidores
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

INTRODUCCIÓN

1- INTRODUCCIÓN

1.1- ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1.1- CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS, SINTOMATOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson es un desorden degenerativo en el que la pérdida de neuronas en los ganglios de la base provoca temblor, bradiquinesia, rigidez e inestabilidad postural. La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la presencia de cuerpos de Lewy y la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) de una de las divisiones anatómicas de la sustancia negra o substantia nigra (SN), la SN pars compacta (SNpc).

Los cuerpos de Lewy son inclusiones proteicas intracitoplasmáticas compuestas principalmente de α -sinucleína y en las que se encuentran otras proteínas relacionadas con la EP. La actividad que los cuerpos de Lewy desempeñan es controvertida, ya que no está claro si causan la degeneración de la célula en la que se hayan o la protegen acumulando proteínas que de otra forma podrían ser dañinas.

Hoy en día se reconoce a la EP como enfermedad neurodegenerativa multisistémica que afecta a diversas vías neuronales y sistemas de neurotransmisores (Hodaie, Neimat y Lozano, 2007). La EP se manifiesta tras la pérdida selectiva de neuronas DAérgicas pigmentadas de la SNpc. Este núcleo mesencefálico inerva el estriado (vía mesoestriatal) y es responsable del control de movimiento voluntario. El descenso en los niveles de dopamina en el estriado causa una pérdida en la regulación del circuito motor de los ganglios basales, un conjunto de núcleos subcorticales que integra la actividad de distintas regiones cerebrales en unos circuitos en los que además de corteza y ganglios de la base también está incluido el tálamo. En el circuito motor las áreas corticales motoras inervan el putamen. En el putamen se originan dos vías distintas, denominadas una directa y otra indirecta, que confluyen en los núcleos de salida de los ganglios de la base, el

globo pálido interno (GPi) y la SN pars reticulata (SNpr). Las neuronas del GPi y de la SNpr inervan el tálamo donde inhiben las neuronas de proyección tálamo-corticales. En la vía directa el putamen envía proyecciones inhibitorias directamente al GPi y SNpr, que dejan de inhibir el tálamo favoreciendo la realización de movimientos voluntarios. En la vía indirecta las neuronas inhibitorias del putamen inervan la porción externa del globo pálido (GPe) que conecta con el núcleo subtalámico, que es quien proyecta al GPi y a la SNpr. La vía directa se ve activada por la innervación DAérgica procedente de las neuronas de la SNpc en el putamen a través de receptores tipo D1, mientras que las neuronas de la vía indirecta poseen receptores D2 que inhiben su descarga. De esta manera la vía directa favorece la realización de movimientos voluntarios mientras que la indirecta evita los involuntarios (DeLong y Wichmann, 2007; Obeso et al., 2002). La degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc encargadas del aporte de DA al putamen provoca la pérdida de la regulación de los movimientos motores característica de la enfermedad de Parkinson.

La pérdida de regulación motora provoca en pacientes afectados por la EP los **síntomas** característicos de la enfermedad: temblor, bradiquinesia, rigidez articular e inestabilidad postural. Estos síntomas motores se han identificado con la propia enfermedad y evidencias experimentales demuestran que están directamente asociados con la pérdida de neuronas dopaminérgicas y la carencia de DA en el estriado. Aun cuando la enfermedad tiene un origen anterior se hace evidente cuando degenera aproximadamente el 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y los niveles de dopamina en el estriado caen hasta un 80% (Braak et al., 2004). Esto se debe a que la enfermedad tiene un desarrollo lento y existen mecanismos compensatorios que enmascaran el déficit neuronal. Debido a la afectación de otras poblaciones y circuitos dentro del sistema nervioso, otros síntomas están asociados a la enfermedad de Parkinson: depresión, ansiedad, trastornos del sueño, apatía, demencia,...que a menudo no se consideran como propios de la EP.

El **diagnóstico** de la enfermedad de Parkinson se basa principalmente en manifestaciones clínicas de tipo motor (Rao, Hofmann y Shakil, 2006). La observación de los síntomas no motores y avances en la medicina moderna han permitido poner a disposición de los clínicos nuevas herramientas para complementar este diagnóstico (Rao, Hofmann y Shakil, 2006; Savitt, Dawson y Dawson, 2006). A menudo se confunde la EP con parkinsonismos, desórdenes neurológicos que no presentan cuerpos de Lewy o degeneración dopaminérgica en la SNpc, debido a que éstos presentan algunos de los síntomas típicos de la EP.

La **etiología** de enfermedad de Parkinson está asociada tanto a factores genéticos como ambientales. El número de casos en los que la enfermedad es debida únicamente a una mutación génica es bajo, siendo sólo la décima parte de los casos descubiertos debidos a factores genéticos. Hasta el momento se han reconocido hasta 13 loci cuyo producto génico se ha relacionado con la aparición de la EP. De entre estos se ha destacado la importancia de los que codifican para los genes de α -sinucleína, parkina, PINK1, DJ-1 y LRRK2 (Thomas y Beal, 2007).

En los casos en los que la EP es idiopática se cree que influye tanto la predisposición genética como distintos factores ambientales. Así se ha relacionado un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad con pesticidas y herbicidas, la exposición a patógenos como virus o bacterias, metales pesados como el hierro y el manganeso, o solventes (Dick, 2006; Klawans et al., 1982; Kochen et al., 2003; Liu, Gao y Hong, 2003; Singh, Ahmad y Kumar, 2007; Uversky, 2007), mientras que cafeína y nicotina parecen proteger de ésta (Soto-Otero et al., 2002; Yuan et al., 2007).

1.1.2- PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Se han propuesto diversos mecanismos que podrían estar implicados la degeneración neuronal que ocurre en la EP. Estudios genéticos centrados en los genes que aparecen mutados en la EP familiar, así como de aquellos casos en los que se producen parkinsonismos proveen causas por las que se puede originar la EP idiopática. Los procesos moleculares que suceden en los pacientes afectados están interrelacionados por el propio metabolismo celular, de forma que en los casos idiopáticos es muy difícil determinar si uno de ellos es la causa originaria de la enfermedad o la consecuencia y manifestación de otros procesos. Además, el hecho de que la enfermedad de Parkinson afecte principalmente a la población mayor y que algunos de los mecanismos patogénicos que se dan en los pacientes afectados se observen en individuos no afectados de avanzada edad complica aún más la interpretación de éstos.

Entre los mecanismos que intervienen en la patogénesis de la EP se han reconocido los siguientes:

Estrés oxidativo: Las especies oxigenadas reactivas (ROS) son moléculas derivadas del metabolismo del oxígeno muy reactivas debido a que poseen electrones desapareados, lo que hace que actúen como radicales libres que interaccionan y alteran diversos componentes celulares. Las células eucariotas han desarrollado mecanismos para protegerse del daño producido por estas especies reactivas y reparar los daños que causan. Cuando la generación de ROS excede la capacidad reparativa de la célula esta sufre muerte necrótica o apoptótica. Las principales fuentes de ROS son la cadena de respiración mitocondrial y la NADPH-oxidasa (Babior, 1999; Babior, 2004; Rodríguez-Pallares et al., 2007; Szeto, 2006). Aunque los niveles de estrés oxidativo en individuos de avanzada edad están elevados en ausencia de la enfermedad, en los afectados se ha visto marcadores de peroxidación lipídica y nitración proteica, con una disminución de moléculas antioxidantes como el glutatión (Gandhi y Wood, 2005; Yuan et al.,

2007). Se ha sugerido que la proteína DJ-1 puede actuar como molécula antioxidante. La mutación en el gen que la codifica, que causa una forma de EP, se ha relacionado con el estrés oxidativo.

Disfunción mitocondrial: La mitocondria es la mayor fuente de ROS, que se originan en los complejos I y III de la cadena de respiración mitocondrial. Debido a que algunas de estas especies reactivas no atraviesan fácilmente la membrana interna de la mitocondria, estos orgánulos son especialmente vulnerables al estrés oxidativo. Esto tiene un efecto deletéreo sobre numerosas moléculas como proteínas encargadas del metabolismo energético y los lípidos de membrana que sufren peroxidación lipídica. Una de las consecuencias del daño en los lípidos es la liberación del citocromo C a través de la membrana, que inicia la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis. Además se produce una caída en la generación de ATP y a los niveles energéticos de la célula, que afectará a su viabilidad. Mientras que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular con niveles normales de ATP, la necrosis es provocada cuando los niveles de ATP son reducidos (Szeto, 2006). Numerosas neurotoxinas se han relacionado con la disfunción mitocondrial y la elevación de la generación de ROS. Pink1 ha mostrado propiedades neuroprotectoras y se ha localizado en la mitocondria, mientras que mutaciones que afectan a este gen provocan una forma recesiva de la EP.

Carencia de factores neurotróficos: Los factores neurotróficos son proteínas señalizadoras involucradas en la regulación génica del desarrollo, mantenimiento y supervivencia de neuronas a través de receptores específicos. Se sabe que las neuronas sufren apoptosis debido al envejecimiento normal del individuo. Algunos autores sostienen la hipótesis de que en el caso de enfermedades degenerativas la tasa de apoptosis es mayor y que en aquellos individuos en el que el número de neuronas cae por debajo de un umbral son los que desarrollan los síntomas. De ello deriva la importancia del número de neuronas que se forman durante el desarrollo y su tasa de supervivencia, características estrechamente vinculadas a la disponibilidad de factores tróficos.

Estudios en el líquido cefalorraquídeo y regiones la vía nigroestriatal de pacientes con EP muestran que los niveles de factores neurotróficos están alterados en comparación con individuos de la misma edad no afectados (Mogi et al., 1999; Nagatsu et al., 2000).

Inflamación: La inflamación es una respuesta tisular a un daño celular. Las células de la microglía son las responsables de la respuesta inmune en el cerebro. Estas células son muy sensibles a cualquier cambio patológico que ocurra en el cerebro, al que responden con un aumento en la secreción de factores neurotróficos. Pero también provocan la secreción de citoquinas proinflamatorias y la activación de la sintasa de óxido nítrico, la NADPH oxidasa y la ciclooxigenasa, que provocan daños en otras células y la progresión de la enfermedad de un modo autoamplificado (Liu, 2006; Liu, Gao y Hong, 2003). Se han observado elevados niveles de citoquinas en el cerebro de individuos afectados por la EP, así como la reacción microglial en etapas tempranas de degeneración neuronal en diversos modelos animales de neurodegeneración (Herrera et al., 2000; Muñoz et al., 2005; Ogata et al., 1997; Rodríguez-Pallares et al., 2007).

Excitotoxicidad: El glutamato es un neurotransmisor común en numerosas sinapsis de tipo excitatorio. La SN recibe innervación glutamatérgica del núcleo subtalámico, y en los afectados de EP esta vía se encuentra hiperactivada (Przedborski, 2005). La inflamación también puede provocar excitotoxicidad mediada por astrocitos (Bezzi et al., 1998). La estimulación glutamatérgica provoca la despolarización de la membrana, que provoca la liberación de calcio de sus reservorios celulares. La pérdida de la regulación del Ca^{++} , que también puede producirse debido al estrés oxidativo o a la caída de los niveles de ATP como consecuencia de la alteración mitocondrial, provoca disfunción sináptica, pérdida de la plasticidad y degeneración neuronal (Mattson, 2007). Como consecuencia la excitotoxicidad mediada por el glutamato es una de las causas que contribuyen a la degeneración dopaminérgica.

Errores en el procesamiento de proteínas: La acumulación proteica es el resultado de un desequilibrio entre la síntesis proteica y sus tasas de agregación y de degradación. El procesamiento incorrecto de las proteínas deriva en un funcionamiento incorrecto de la neurona y su muerte. Se ha vinculado la EP tanto con la degradación proteosómica como con la autofágica-lisosomal (Shacka, Roth y Zhang, 2008). El proteosoma es un complejo proteico con actividad proteasa dirigida a proteínas señalizadas con ubiquitina. UCHL1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase) está considerada la enzima encargada de la liberación de ubiquitina que identificará las proteínas a degradar. La parkina cataliza la ubiquitinación de las proteínas dañadas uniéndolas a la cadena aminoacídica de moléculas de ubiquitina. La aparición de EP familiar se ha atribuido a mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas (Shimura et al., 2000). Por otra parte, genes vinculados con el tráfico y fusión de vesículas también han sido vinculados con la EP, como es el caso de la LRRK2 (Thomas y Beal, 2007). La sinucleína también parece tener un papel en el transporte vesicular aunque su mayoritaria presencia en los cuerpos de Lewy, incluso en casos en los que el gen no está mutado, sugiere que contribuye a la neurodegeneración por la alteración de la degradación proteica y su acumulación y formación de agregados (Kruger et al., 2002).

Distintos estudios parecen demostrar que la EP no se origina en la SN, sino que afecta antes a la médula y a los núcleos del rafe (Braak et al., 2004). Una vez que la SN es afectada, la progresión de la degeneración en este núcleo es mucho más rápida debido a las especiales características de las células DAérgicas mesencefálicas (Lang, 2007). Entre las características que se han relacionado con la vulnerabilidad de las células DA (Sulzer, 2007) hay que destacar:

- La estructura: El tamaño y la complejidad de las neuronas DA, cuyo soma representa solamente el 1% del total de la célula y posee unas 150.000 terminales en el estriado, las hace especialmente susceptibles a la neurodegeneración provocada por mutaciones en genes que regulan el tráfico intracelular.

- La actividad neuronal: Las células dopaminérgicas de la SN poseen tanto un patrón tónico de descarga neuronal como uno fásico. Esto supone un gran requerimiento de energía en forma de ATP y GTP para mantener los flujos de cationes de Ca^{++} y K^{+} que de otra forma serían neurotóxicos, especialmente el Ca^{++} , que podría inducir estrés oxidativo y excitotoxicidad. Debido al gran requerimiento de energía, estas células poseen una alta tasa de metabolismo oxidativo y son especialmente susceptibles a alteraciones en la función mitocondrial.
- Susceptibilidad al estrés oxidativo: Además del elevado metabolismo energético que las hace más vulnerables al estrés oxidativo, estas células poseen DA citosólica que puede dar lugar a ROS a través de mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos (Esposito, Di Matteo y Di Giovanni, 2007). La DA es sintetizada en el citosol y transportada por el VMAT (Vesicular monoamine transporter) al interior de vesículas para evitar la mencionada formación de ROS (Lotharius y Brundin, 2002). Pero si este transporte se ve afectado los altos niveles de DA citosólica provocan estrés oxidativo. Las células DA poseen elevadas concentraciones de antioxidantes, como el glutatión, para hacer frente al estrés oxidativo, pero cuando la célula es sometida a una elevada carga de ROS los mecanismos antioxidativos se ven desbordados y se vuelven insuficientes. La neuromelanina (NM) es una sustancia que se acumula en las células DA de la SN dándoles un color típico a las células y a este núcleo (de ahí “sustancia negra”). La NM es un derivado del metabolismo de la DA que se acumula en vesículas autofagocíticas y es capaz de secuestrar hierro y actuar como mecanismo antioxidativo (Zecca et al., 2006). Cuando la célula en la que se halla degenera esta NM pasa al espacio intercelular donde se puede liberar el hierro que contiene y aumentar el daño oxidativo. Además se sabe que en individuos de edad avanzada la degradación autofagocítica se ve afectada, por lo que células que producen altos niveles de NM la acumulan en el citoplasma y se pone en peligro el transporte vesicular. Si la célula degenera la activación microglial que provoca o que la recaptación de NM por otras células provocará la progresión del ciclo de degeneración que sucede en la SN de los individuos afectados de la EP (Esposito, Di Matteo y Di Giovanni, 2007; Sulzer, 2007).

Algunas hipótesis sugieren que el inicio de la EP se debe a un único mecanismo patobiológico (como un agente viral, agregación proteica o deficiencias mitocondriales) y que posteriormente la especial biología de las neuronas de la SN provocan su degeneración (Hawkes, Del Tredici y Braak, 2007; Lang, 2007). Otras hipótesis sugieren que son necesarios varios mecanismos patogénicos. Pueden existir mecanismos primarios que aumentan el estrés celular y que precisan de otros procesos que provoquen la pérdida o inhibición de los mecanismos de protección para provocar la degeneración (Sulzer, 2007). En este caso el daño puede producirse en distintas etapas de la vida del individuo, incluso originarse durante la gestación (Barlow et al., 2007; Esposito, Di Matteo y Di Giovanni, 2007). Otros autores sugieren que dada la diversidad de mecanismos etiológicos y patogénicos asociados, la EP no es en sí una enfermedad, sino un conjunto de manifestaciones fenotípicamente idénticas. La afección se originaría de formas diversas y posteriormente la estrecha interrelación existente entre los distintos mecanismos patogénicos y la vulnerabilidad de las neuronas DA hacen que presente las mismas características y se manifiesten los mismos síntomas.

1.1.3- MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad propia del ser humano y no se conocen otras especies que desarrollen esta patología. Es por ello que para su estudio fue necesario la creación de distintos modelos animales de la EP. Estos modelos sirven para el estudio de la enfermedad, su origen, progresión y mecanismos involucrados. Además son una herramienta imprescindible para el descubrimiento y desarrollo de terapias destinadas al uso clínico en humanos y el diseño y perfeccionamiento de pruebas diagnósticas.

Los primeros modelos de EP se lograron mediante el uso de agentes como la reserpina, capaz de reducir los niveles de DA en las sinapsis. Sus efectos son reversibles y no produce la degeneración DAérgica observada en los cerebros de EP, aunque su uso facilitó el descubrimiento de los mecanismos causales de los síntomas motores en la EP (Dawson, Mandir y Lee, 2002).

Mediante el empleo de neurotoxinas se puede lograr la degeneración de las neuronas DAérgicas, replicando en animales muchos de los aspectos observados en pacientes afectados por la EP. De entre las neurotoxinas empleadas, hay que destacar la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)

La 6-OHDA fue la primera neurotoxina dopaminérgica descubierta, y sigue siendo utilizada para obtener modelos animales de la EP (Ungerstedt, 1968). Es un análogo hidroxilado de la DA que no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que debe ser administrado intracerebralmente para poder alcanzar las células DAérgicas de la SN. En el sistema nervioso es captado de forma específica por parte de células catecolaminérgicas a través de los transportadores de dopamina y noradrenalina, usándose desipramina para bloquear este último y provocar la muerte selectiva de las neuronas DAérgicas. El mecanismo de acción de esta neurotoxina ha sido vinculado principalmente al estrés oxidativo a través de ROS.

El MPTP es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y ser transformado en células no dopaminérgicas a MPP⁺, que será captado por el transportador de DA provocando la degeneración DAérgica al actuar como un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Bove et al., 2005; Schober, 2004).

Otras neurotoxinas usadas para la obtención de modelos animales de EP son los pesticidas rotenona, paraquat y maneb. Todas estas neurotoxinas han sido relacionadas con estrés oxidativo y la alteración de la función mitocondrial, aunque su modo de acción no se limita a estos mecanismos patogénicos, como es el caso de la 6-OHDA con diversas actividades capaces de causar daño celular y degeneración en neuronas DAérgicas (Rodríguez-Pallares et al., 2007; Simola, Morelli y Carta, 2007).

El descubrimiento de los genes implicados en la aparición de la EP familiar supuso una nueva aproximación para la generación de modelos genéticos de la EP. La reducción de la expresión de

un gen o su sobreexpresión puede conducir a la aparición en animales de experimentación de manifestaciones que equivalen a las observadas en pacientes de EP, haciendo de estos modelos útiles para el estudio de la enfermedad. Entre los genes involucrados en casos de EP de tipo familiar que han servido para el desarrollo de modelos están los ya mencionados α -sincucleína, parkina, DJ-1, UCHL1, Pink1 y LRRK2. El descubrimiento de genes necesarios para el desarrollo de neuronas DAérgicas como el *nurr1* y el *ptx3* (Véase 1.3- DESARROLLO DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS) facilitó claves para conocer las causas de la susceptibilidad de estas neuronas a la degeneración y el desarrollo de nuevos modelos génicos de la EP (Fleming, Fernagut y Chesselet, 2005).

Ninguno de los modelos existentes actualmente es capaz de reproducir fielmente todas las alteraciones patológicas de la enfermedad, lo que permite el estudio de sólo ciertos aspectos de la enfermedad en cada uno de ellos. Esta deficiencia hace necesario el desarrollo de nuevos modelos o el perfeccionamiento de los ya existentes. Algunos autores sugieren basándose en hipótesis que la combinación de varios modelos en un mismo animal de experimentación es necesaria para obtener un modelo adecuado para el estudio de la EP (Carvey, Punati y Newman, 2006).

1.1.4- TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

El tratamiento ideal de una enfermedad neurodegenerativa es aquel que revierta, o al menos ralentice o detenga la progresión de la enfermedad. A pesar del interés que genera la EP y los esfuerzos investigadores hasta el momento ningún tratamiento ha demostrado ser efectivo en este sentido para su uso clínico en EP.

A- TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

La terapia actual de la EP se basa en el tratamiento farmacológico de los síntomas motores de la EP. Partiendo de la idea de que las alteraciones motoras son debidas a un déficit del neurotransmisor DA en el estriado de los individuos afectados, el tratamiento se basa en la restitución de los niveles de DA, o imitando sus efectos mediante el uso de agonistas.

La dopamina no atraviesa la barrera hematoencefálica, pero si lo hace el precursor inmediato de este neurotransmisor, la L-DOPA (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina). El tratamiento con L-DOPA es el tratamiento más efectivo frente a los síntomas de la EP. La L-DOPA puede ser metabolizada a dopamina fácilmente incluso por células no dopaminérgicas que posean la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC). Dado que esta conversión puede suceder fuera del sistema nervioso que limita su disponibilidad en el sistema nervioso central además de tener efectos secundarios adversos, se usa combinado con la carbidopa, un inhibidor de la dopadescarboxilasa periférica que aumentan la disponibilidad de la L-DOPA en el cerebro al tiempo que evita los efectos periféricos adversos (Rao, Hofmann y Shakil, 2006).

El tratamiento con la L-DOPA con el tiempo se vuelve problemático debido a la aparición de complicaciones en la respuesta motora. Pasados unos 4-6 años de uso la L-DOPA presenta fluctuaciones en su efectividad, con periodos en los que reaparecen los síntomas, que en parte se soluciona con inhibidores de las enzimas que metabolizan la DA en el cerebro (monoaminoxidasa, MAO, y catecolortometiltransferasa, COMT) y alteraciones propias de los

pacientes en tratamiento, como disquinesias y movimientos involuntarios. La aparición de estas complicaciones y el hecho de que en animales de laboratorio la L-DOPA puede incrementar los niveles de estrés oxidativo y acelerar la neurodegeneración provocó controversia sobre su uso en estadios tempranos de la EP. Por ello se utilizan agonistas de DA, inhibidores de la MAO-B y COMT y antagonistas de NMDA y del glutamato en el tratamiento de los síntomas en fases tempranas de la enfermedad (Hauser y Zesiewicz, 2007; Singh, Pillay y Choonara, 2007).

B- TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

En pacientes en fases tardías de la enfermedad -en las que las complicaciones debidas al uso de la L-DOPA son inhabilitantes- se suelen emplear estrategias neuroquirúrgicas basadas en modelos de funcionamiento de los ganglios basales y los resultados positivos de ciertas ablaciones quirúrgicas. Se observó que la ablación quirúrgica en el globo pálido y en el tálamo provocaba una mejoría en los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson. Estas observaciones encajaban con modelos en los que la hiperactividad de núcleos propios de la vía indirecta de los ganglios basales (globo pálido y núcleo subtalámico) provocaba un descenso en el tono talamocortical y la estimulación del córtex motor.

La estimulación cerebral profunda utiliza un electrodo que es implantado estereotácticamente en el núcleo elegido para su estimulación eléctrica (Benabid, 2003). Se cree que actúa de modo similar a las ablaciones quirúrgicas, pero tiene las ventajas de que es ajustable, reversible y con menores efectos secundarios. En este caso tampoco están exentos de complicaciones debidas a la cirugía o derivadas del mal funcionamiento de los equipos empleados (Singh, Pillay y Choonara, 2007). STN, GPi o el núcleo talámico ventral intermedio son algunos de los núcleos que mejores resultados ofrecen a estas aproximaciones (Hodaie, Neimat y Lozano, 2007; Lang, 2000) Debido a las posibles complicaciones inherentes a la técnica y a la variabilidad de la respuesta en distintos individuos y grados de afectación el tratamiento quirúrgico no está recomendado para todos los pacientes.

C- TERAPIA NEUROPROTECTORA

La terapia neuroprotectora es aquella que busca preservar las células y circuitos neurales con el fin de retrasar, ralentizar o incluso detener la aparición y progresión de la enfermedad de Parkinson una vez iniciado el tratamiento. Se están probando distintas moléculas, y aunque ninguna de ellas se ha mostrado efectiva interrumpiendo la progresión de la enfermedad, muchas han mostrado mejorías clínicas prometedoras. Estos fármacos tienen como diana los mecanismos patogénicos de la EP descritos anteriormente.

Se han probado diversas moléculas que disminuyen el **estrés oxidativo** generado en las neuronas dopaminérgicas (Singh, Pillay y Choonara, 2007). Las vitaminas A, C y E son antioxidantes, pudiendo reducir los niveles de peroxidación lipídica. Algunos autores sugieren que una aporte dietario deficiente podría incrementar la susceptibilidad a la enfermedad. Inhibidores de la MAO además de incrementar la disponibilidad de DA en el SN han mostrado propiedades neuroprotectoras relacionadas con la reducción del estrés oxidativo. El selenio también posee actividad neuroprotectoras por su relación con el metabolismo del glutatión. Además de las ya mencionadas nuevos estudios ponen de manifiesto las características neuroprotectoras de otras moléculas capaces de reducir el estrés oxidativo, como la N-acetil-cisteína, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina o la nicotina (Lopez-Real et al., 2005; Muñoz et al., 2004; Soto-Otero et al., 2002)

Moléculas neuroprotectoras relacionadas con la **función mitocondrial** son la coenzima Q10 y la creatina. La coenzima Q10, también denominada ubiquinona, es un componente de la cadena respiratoria mitocondrial implicado en la generación de ATP y que además tiene propiedades antioxidantes. La creatina es una molécula que es capaz de almacenar energía química y permite la formación de ATP en la mitocondria (Bonuccelli y Del Dotto, 2006).

Para reducir la **excitotoxicidad** que ocurre en pacientes de la EP se han probado inhibidores de la liberación de glutamato como el riluzol, antagonistas de receptores NMDA y bloqueadores de canales de Ca^{++} (Bonuccelli y Del Dotto, 2006; Rodriguez, Obeso y Olanow, 1998).

La carencia de **factores neurotróficos** se puede compensar mediante el uso de neuropéptidos de la familia del factor de crecimiento derivado de la glía, GDNF (Evans y Barker, 2008; Yasuhara, Shingo y Date, 2007). Otros fármacos tienen propiedades neuroprotectoras relacionadas con la expresión *in situ* de factores neurotróficos, favoreciendo la expresión de estos factores por parte de células presentes en el propio sistema nervioso (Sanchez et al., 2002). El ejercicio físico también favorece la supervivencia al inducir la expresión y aumentar la disponibilidad de diversos factores neurotróficos dentro y fuera del sistema nervioso.

Debido al papel que la **inflamación** tiene en la patogénesis de la EP, el uso de agentes que reduzcan la reacción microglial o moléculas antiinflamatorias como inhibidores de la ciclooxigenasa o antiinflamatorios no esteroideos ha mostrado tener efectos beneficiosos en afectados por la EP (Bonuccelli y Del Dotto, 2006; Wilms et al., 2007).

Para evitar los daños producidos por el incorrecto **procesado de las proteínas** se ha propuesto el uso de activadores de la función del proteosoma. Además de tener un papel importante en la generación de ROS en neuronas DA, el hierro acelera la agregación de la α -sinucleína, y agentes quelantes del hierro reducen la formación de agregados proteicos (Schapira y Olanow, 2004).

También se están desarrollando “vacunas” que ayuden a prevenir la aparición de la enfermedad. El uso de sustancias capaces de inducir la activación de linfocitos T capaces de liberar citoquinas antiinflamatorias y favorecer la expresión de GDNF en el cerebro o inmunizados con agregados de α -sinucleína se han mostrado efectivos en modelos experimentales (Benner et al., 2004; Masliah et al., 2005).

D- TERAPIA GÉNICA

El desarrollo de la medicina molecular ha permitido la utilización de estrategias de terapia génica para el posible tratamiento de la EP. Una de las principales ventajas de esta aproximación es que permite la manipulación de la liberación del producto génico en localizaciones concretas, en las cantidades necesarias y de forma regulada, mediante el uso de vectores víricos (adenovirus y lentivirus, principalmente) o no víricos (lisosomas) (Singh, Pillay y Choonara, 2007).

Se han aplicado distintos enfoques al tratamiento de la EP mediante el uso de terapia génica (Hodaie, Neimat y Lozano, 2007):

1. Las destinadas proveer al estriado de los enzimas necesarios para la síntesis de DA, como la tirosina hidroxilasa (TH), o la AADC de forma que se evitan los efectos adversos de su distribución sistémica.
2. Basadas en la expresión del factor neurotrófico GDNF en la SN y el estriado para la neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas y el mantenimiento de la vía nigroestriatal,
3. Manipulaciones de la función del circuito de los ganglios basales mediante el uso de genes como el de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, de sus siglas en inglés). Cuando es transferido al núcleo subtalámico sintetiza el neurotransmisor GABA y de esta forma inhibe la excitación patológica que sucede en este núcleo.
4. Algunos trabajos también apuntan hacia los genes defectivos en la EP de tipo familiar como posible diana de actuación de la terapia génica.

A pesar del enorme potencial de esta aproximación hasta ahora los resultados distan mucho de ser los esperados, con la aparición de efectos secundarios no deseados en ciertos tratamientos y con reservas en cuanto al uso de vectores virales para su uso clínico.

E- TERAPIA REGENERATIVA Y REPARATIVA

Algunas de las estrategias neuroprotectoras anteriormente mencionadas, debido al efecto de rebrote que tienen sobre las terminales dopaminérgicas que todavía no han degenerado, podrían llegar favorecer la reinervación del estriado y provocar una mejoría en el afectado. En sentido estricto la **regeneración neuronal** se basa en el uso de células para volver a formar los circuitos neuronales dañados. También se suele utilizar cuando la recuperación funcional se logra gracias a citoquinas o factores tróficos secretados por células trasplantadas (Takahashi, 2007). Hay que destacar la importancia de este tipo de terapia, que permite la recuperación y restablecimiento de circuitos neuronales ya perdidos. Este hecho tiene un especial interés en la EP ya que los síntomas que permiten el diagnóstico de la enfermedad empiezan a manifestarse cuando ya ha sucedido una degeneración neuronal importante.

El trasplante celular ha demostrado en ensayos clínicos ser efectivo en el tratamiento de la EP. A pesar de ello su eficacia está aún lejos de ser óptima, y todavía hay muchos aspectos relacionados con el trasplante sobre los que se debe trabajar para lograr de éste el mayor beneficio posible.

Los trasplantes celulares pueden actuar de distintos modos para lograr la recuperación del paciente: Mediante la liberación de DA directamente por parte de las células trasplantadas, por medio de la liberación de factores neurotróficos que favorezcan la supervivencia y la funcionalidad de las neuronas situadas en la sustancia negra, o por la acción local que permita la reinervación y el rebrote de terminales estriatales para la liberación de DA (Takahashi, 2007).

Ciertos implantes celulares pueden actuar secretando moléculas distintas de la DA en el lugar del implante, sin establecer contactos sinápticos con el tejido hospedador pero pudiendo favorecer la regeneración de las conexiones perdidas en el transcurso de la enfermedad. Un ejemplo típico son las células transfectadas con factores neurotróficos como GDNF, BDNF, bFGF o VEGF (Arenas,

2002; Levivier et al., 1995; Takayama et al., 1995; Yasuhara, Shingo y Date, 2007). Las células cromafines o las del cuerpo carotídeo son células capaces de producir GDNF de forma natural. Agregados de estas células pueden ser empleados en trasplantes autólogos que evitarían problemas de rechazo inmunológico.

La tecnología de **encapsulación celular** con polímeros biocompatibles permite el uso de diversos tipos celulares para su trasplante. El uso de células encapsuladas presenta las ventajas de que diversas sustancias (neurotransmisores, factores neurotróficos o de crecimiento,...) pueden ser secretados de forma continua sin rechazo inmunológico o formación de tumores, pudiendo ser encapsulada prácticamente cualquier tipo de célula y la cápsula puede ser retirada del cerebro (Yasuhara, Shingo y Date, 2007). Células productoras de dopamina pueden ser encapsuladas e implantadas para incrementar el aporte de este neurotransmisor en el estriado. Para controlar la síntesis de DA estas células encapsuladas pueden modificarse genéticamente de modo que la expresión de la enzima TH, responsable de la síntesis catecolaminérgica, pueda ser regulada. Sin embargo las células son incapaces de establecer conexiones nerviosas con el hospedador, debido a la presencia de la cápsula.

El **trasplante de células fetales** procedentes del mesencéfalo humano fue una de las primeras terapias probadas para el tratamiento clínico de la enfermedad. Las células de la zona ventral del mesencéfalo en desarrollo son las que darán lugar a las neuronas DA que degeneran en la EP. El uso de este tejido en terapia para la EP se fundamenta en dos hipótesis, una que los principales síntomas de la EP son debidos a la pérdida de innervación dopaminérgica de la vía mesoestriatal y otra que las neuronas dopaminérgicas que pueden llegar a diferenciarse del tejido implantado permitirían el aporte de DA al estriado. El restablecimiento de conexiones DAérgicas dentro del propio estriado podría mejorar el estado de los pacientes, a pesar de que la EP es crónica y afecta a otros circuitos y regiones (Lindvall y Bjorklund, 2004). Para lograr la mejora clínica las células deben ser capaces de sobrevivir, mantener un fenotipo funcional y establecer sinapsis en el

cerebro del paciente; el cerebro debe de ser capaz de integrar y usar las células trasplantadas, evitando el rechazo o reacción inflamatoria que provoque la degeneración del tejido implantado; y la interacción trasplante-tejido hospedador debe ser tal que permita el restablecimiento de circuitos y conexiones nerviosas adecuadas y con una secreción de DA correcta, que redundaría en la mejora clínica deseada (Gupta y Dawson, 2007).

Ensayos clínicos han mostrado que el tejido mesencefálico fetal implantado en el estriado es capaz de sobrevivir, originar neuronas fisiológicamente activas y capaces de sintetizar y liberar dopamina y formar conexiones nerviosas con células adyacentes. Los ensayos más exitosos han permitido al paciente que recibe el implante discontinuar la terapia con L-DOPA. Sin embargo estudios a doble ciego han mostrado que la efectividad del trasplante para revertir los síntomas de la enfermedad es muy variable, aun cuando estudios postmortem muestran la supervivencia de las células del trasplante. Además en un 15-20% de los pacientes se producen disquinesias cuya aparición no está todavía aclarada (Yasuhara, Shingo y Date, 2007). El balance entre riesgos y beneficios han conducido al replanteamiento del uso de tejido fetal para la terapia de la EP. Se han señalado distintos aspectos que habrá que tener en cuenta antes de seguir con estos ensayos clínicos (Lindvall y Bjorklund, 2004), como son:

- Es necesario que la mejora clínica lograda con este tratamiento sea aún mayor
- La variabilidad en la respuesta al trasplante debe ser reducida, para lo cual habrá que tener en cuenta factores como la selección de los pacientes, el lugar del implante, la composición y la preparación del tejido a trasplantar y controlar la respuesta inmunológica asociada al uso de material alogénico que podría poner en peligro la supervivencia del trasplante a largo plazo.
- Se requiere el desarrollo de técnicas para la generación de células DAérgicas en cantidad suficiente para hacer viable clínicamente su uso en trasplantes.

- El mecanismo responsable de las disquinesias debe de ser descubierto y se debe de poder evitar en futuros trasplantes

El uso de tejido mesencefálico fetal para trasplante conlleva serias dificultades técnicas. Se necesitan numerosos fetos procedentes de abortos para proveer el tejido suficiente para lograr mejora sintomática, la edad del feto, el tiempo que se mantiene el tejido in vitro y la forma de prepararlo para el trasplante influyen en la supervivencia de las células dopaminérgicas y en la mejora clínica obtenida. La escasez de tejido fetal humano y la ausencia de un protocolo estandarizado que conlleva una gran variabilidad en los resultados obtenidos son importantes problemas asociados con este material. Además el uso de fetos conlleva graves dilemas éticos y religiosos, así como posibilidad de infecciones procedentes del tejido trasplantado (Bjorklund et al., 2003; Dawson, 2005; Dunnett, Bjorklund y Lindvall, 2001; Olanow, Kordower y Freeman, 1996; Piccini et al., 2005).

Es por ello que son necesarias nuevas fuentes de células dopaminérgicas alternativas al uso de tejido fetal. Las células troncales son las más atractivas dado su capacidad proliferativa y su potencial para dar distintos tipos de células. Otras alternativas al uso de embriones humanos es el uso de material procedente de especies distintas por medio de xenotrasplantes. El uso de tejido porcino fetal ya ha sido probado en pacientes de EP con resultados prometedores (Fink et al., 2000), pero tiene graves inconvenientes como el rechazo inmunológico y el riesgo de infección por parte de retrovirus de origen porcino.

1.2- CÉLULAS TRONCALES / PROGENITORAS

Una célula madre o troncal se define como una célula con capacidad de proliferar y autoreplicarse, dando lugar a más células idénticas a la original, y diferenciarse en distintos tipos celulares. Una célula troncal que se divida de forma simétrica dará lugar a dos células con las mismas características que la célula de la que proceden e idénticas entre si. Si la división es asimétrica la célula dará lugar a dos células diferentes entre si, lo cual permite la generación de distintos tipos y linajes celulares a partir de una única célula. Si las células troncales se hallan en las condiciones adecuadas y reciben la señalización necesaria pueden originar los distintos tipos celulares de los que son precursoras. Las células troncales, debido a su potencial para replicarse y diferenciarse en distintos tipos celulares, podrían dar lugar a un número ilimitado de neuronas dopaminérgicas destinadas al tratamiento de la EP. Estas células pueden ser modificadas para su uso en terapia génica y servir de medio para liberar factores neurotróficos o distintas enzimas (ver 1.1D3- TERAPIA NEUROPROTECTORA y 1.1D4- TERAPIA GÉNICA). Además se ha mostrado su validez como modelo de distintas enfermedades y para probar el efecto de fármacos sobre las células (Singec et al., 2007).

Las células troncales pueden ser exitosamente empleadas en la terapia regenerativa de la EP. Se ha mostrado que tanto trasplantes de células indiferenciadas en el estriado denervado como células dopaminérgicas diferenciadas in vitro y posteriormente trasplantadas logran mejorar los síntomas de modelos animales de EP estudiados.

Distintos tipos de células troncales se han propuesto como alternativa al uso de tejido mesencefálico para la obtención de células DAérgicas. Las células troncales embrionarias, las células troncales neurales, células troncales no neurales y células troncales partenogenéticas o provenientes de la transferencia nuclear son ejemplos de este tipo de células que han sido propuestos para su uso en terapia celular de la EP (Bjorklund et al., 2003; Singec et al., 2007).

1.2.1- CÉLULAS TRONCALES TOTIPOTENCIALES

Las células tronco embrionarias (ESC) derivan de la masa celular interna del blastocito. Tienen capacidad para crecer de forma indefinida y, dada su versatilidad para dar lugar a cualquier célula del organismo, (aunque no los tejidos extraembrionarios y por ello tampoco podrían dar lugar a embriones completos) son totipotentes. Otras células troncales con totipotencialidad son las células germinales embrionarias (EGC), que se diferencian de las anteriores por proceder del embrión ya implantado, y las células troncales presentes en el tejido conectivo de adultos (Kim, 2007, Young et al., 2005) Las ESC son las células más empleadas en estudios de regeneración tisular debido a que pueden seguir proliferando tras múltiples pases en cultivo sin perder la capacidad seguir dando lugar a células muy diversas.

Las células ESC tienen potencial para dar lugar a cualquier clase de célula y la lista de tipos celulares que se han logrado obtener a partir de éstas se incrementa continuamente. Aunque las ESC son capaces de diferenciarse a células DAérgicas cuando son trasplantadas al estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA la formación de tumores por parte de estas células desaconseja el uso de estas células sin diferenciar (Trzaska y Rameshwar, 2007).

Para la obtención de neuronas a partir de células troncales se requieren dos procesos sucesivos, el primero la determinación hacia la estirpe neural, y el segundo la diferenciación neuronal. Lo primero se logra manteniendo las ESC en cultivos adherentes (se ha sugerido que la diferenciación neural es el destino por defecto de las ESC) o haciéndolas crecer en cultivo como estructuras flotantes denominadas cuerpos embrioides. Usando distintos protocolos las células de los cuerpos embrioides pueden ser diferenciados a varios tipos neuronales (Singec et al., 2007). Para la diferenciación a células dopaminérgicas se han empleado básicamente dos protocolos, uno que consiste en 5 etapas secuenciales las células son tratadas con moléculas señalizadoras (ácido ascórbico, EGF, FGF-2, FGF-8 y Shh) que dirigen su diferenciación hacia el fenotipo

dopaminérgico, mientras que el otro protocolo requiere el cultivo sobre una capa de células procedentes de la médula ósea, en lo que se ha denominado actividad inductora derivada de las células estromales (SDIA, de sus siglas en inglés) y en la que la diferenciación también puede ser dirigida hacia el fenotipo DAérgico (Kawasaki, Mizuseki y Sasai, 2002; Lee et al., 2000). Células DAérgicas diferenciadas en modelos de la EP han mostrado mejora en los síntomas de los animales, demostrando la utilidad de estas células para trasplantes en terapia regenerativa.

1.2.2- CÉLULAS TRONCALES NEURALES

Posteriormente durante el desarrollo las células madre pierden totipotencialidad, dando lugar a células troncales somáticas que serán capaces de diferenciarse en células de una de las tres capas embrionarias, esto es, células ectodérmicas, mesodérmicas o endodérmicas. Células ectodérmicas forman el epitelio nervioso del que deriva el sistema nervioso de los mamíferos.

Las células troncales neurales y las células progenitoras neurales (NSC y NPC, de las siglas de *Neural Stem Cells* y *Neural Progenitor Cells*) también tienen la capacidad de autoreplicarse, y capacidad para diferenciarse en las tres clases principales de células del sistema nervioso neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Kim, 2007). Las NSC pueden hallarse no sólo en el sistema nervioso en desarrollo, sino también en adultos (Hagg, 2005).

Posteriormente estas células darán lugar a distintos progenitores, células con una capacidad replicativa y potencialidad más restringida, pudiendo dar lugar a un número más limitado de tipos celulares distintos. Las células progenitoras pierden rápidamente su capacidad proliferativa, de forma que sólo pueden dividirse un número limitado de veces y seguir dando lugar a células de distintos fenotipos.

Las células NS se pueden cultivar in vitro adheridas a un sustrato o como neuroesferas no adheridas. Las neuroesferas han sido definidas como estructuras flotantes que pueden ser

obtenidas cuando se expone tejido nervioso disociado a factores de crecimiento (Campos, 2004). La formación de neuroesferas se puede emplear no sólo para la generación de células para ser usadas en terapia regenerativa, sino también para demostrar a nivel experimental la presencia de células troncales neurales en el sistema nervioso y como modelo in vitro para el estudio del sistema nervioso en desarrollo. Cuando las NSC son cultivadas como neuroesferas se pueden mantener proliferando durante mucho tiempo en presencia de mitógenos como el FGF-2 o el EGF.

1.2.3- CÉLULAS TRONCALES NO NEURALES

Aunque las NSC están especificadas para dar lugar a células de la estirpe neural, no están determinadas, por lo cual en las condiciones adecuadas pueden dar lugar a células de otras capas embrionarias. De igual modo se puede manipular la diferenciación de células de otras capas embrionarias para dar lugar a neuronas. La conversión de una célula de una capa embrionaria a células de capas embrionarias distintas de la que procede se denomina transdiferenciación. Las causas de la transdiferenciación no están claras, y se ha sugerido que no es una propiedad intrínseca de las células troncales presentes in vivo sino que es debida al efecto de factores de crecimiento y su proliferación in vitro (Arenas, 2002; Trzaska y Rameshwar, 2007).

Las células madre no neurales más empleadas en terapia regenerativa son las mesenquimales. Estas células troncales aisladas de la médula ósea pueden diferenciarse a células neurales, desde oligodendrocitos a neuronas, incluyendo neuronas dopaminérgicas. Pero su potencial terapéutico en la EP ha sido cuestionado debido a su origen mesodérmico (Trzaska y Rameshwar, 2007). También es posible conseguir células DAérgicas a partir de células obtenidas del cordón umbilical y astrocitos a partir de células madre hematopoyéticas.

1.2.4- PROGENITORES NEURALES *IN VIVO*

En el cerebro adulto existen células situadas en la zona subventricular y en el giro dentado del hipocampo que son capaces de dar lugar a neuronas en condiciones no patológicas. Además de en estas zonas neurogénicas, se ha demostrado la presencia de NSC en otras zonas del cerebro clásicamente no neurogénicas (Colombo et al., 2006), como la SNpc, donde nuevas neuronas dopaminérgicas se generan, y parecen establecer sinapsis en el estriado. Estos progenitores neurales presentes en el propio cerebro podrían ser usados como fuente de células destinadas a reemplazar las células perdidas durante la enfermedad (Borta y Hoglinger, 2007; Sohur et al., 2006; Storch y Schwarz, 2002; Zhao, Deng y Gage, 2008). Sin embargo los progenitores neurales no son capaces de reparar la degeneración que ocurre en un el cerebro del afectado. Las causas propuestas para explicar esta falta de efectividad incluyen un bajo número de precursores para llevar a cabo la regeneración, que no son capaces de alcanzar su diana y/o que las condiciones del lugar concreto donde se desarrolla la patología no son las más adecuadas para que estas células proliferen y lleven a cabo la reparación necesaria (Kim, 2007; Singec et al., 2007). Por ello para poder aprovecharlas terapéuticamente se debería potenciar la capacidad proliferativa y migratoria de estas células, además de proveerlas de los factores tróficos para que sean capaces de regenerar las poblaciones neuronales perdidas por la enfermedad.

1.2.5- CÉLULAS TRONCALES OBTENIDAS ARTIFICIALMENTE

Las células partenogenéticas son aquellas que se desarrollan a partir de un oocito sin que haya participación masculina. La partenogénesis ocurre en ciertas especies de forma natural, pero no así en los mamíferos donde la intervención *in vitro* es necesaria para provocar este fenómeno (Vrana et al., 2003). Las células así obtenidas serían inmunológicamente compatibles con el huésped, pero su desarrollo se ve interrumpido debido a la impronta materna de las células de las que derivan y a la presencia de alelos homocigóticos defectuosos (Bjorklund et al., 2003).

Mediante la transferencia nuclear se puede tomar el núcleo de una célula somática y llevarlo al interior de un oocito al que se le ha retirado su material genético. En las condiciones adecuadas la célula resultante es capaz de dividirse y dar lugar a células de distintos tejidos que poseen el material genético de la célula somática de la que proceden. Aunque este método se ha logrado desarrollar en animales de laboratorio las mismas técnicas no pudieron ser empleadas para la reprogramación de células humanas, debido a diferencias que existen entre las células de diferentes especies (Singec et al., 2007). Nuevas formas de reprogramación y “dediferenciación” (revertir el proceso natural de diferenciación celular) están siendo investigadas para lograr células troncales a partir de células somáticas. Son ejemplos el tratamiento de células somáticas con extractos de troncales o moléculas sintéticas, la fusión de células somáticas con troncales, la expresión inducida de genes que confieren características de células troncales (Alberio, Campbell y Johnson, 2006)

La elección del material de partida a utilizar para la terapia regenerativa es tema de profundo debate debido a las ventajas y desventajas de las distintas fuentes de material que se pueden emplear.

- **Disponibilidad de tejido**

La principal limitación para el uso clínico de tejido fetal es su escasa disponibilidad, necesitándose al menos el mesencéfalo de cinco fetos abortados por paciente (Arenas, 2002; Bjorklund et al., 2003). La necesidad de un suministro continuo y abundante de neuronas DAérgicas con fines terapéuticos favorece la adopción de las células troncales como material de partida para la terapia regenerativa. Su capacidad proliferativa permite obtener un elevado número de células a partir de unas pocas, lo que permite la caracterización y estandarización de las células a trasplantar. Las células troncales embrionarias tienen ciclo celular más corto que las somáticas, lo que permite obtener un mayor número de células en menos tiempo.

Las líneas celulares también presentan una capacidad proliferativa ilimitada, y son susceptibles de ser modificadas genéticamente para expresar genes encargados de la síntesis de DA.

El uso de animales como fuente de tejido podría también proporcionar abundante tejido susceptible de ser xenotrasplantado. Con este propósito se han propuesto como candidatas células de origen porcino, que además de su mayor parecido a las células humanas que otras especies, presentan mayor facilidad de cría y un elevado número de fetos por camada.

▪ **Supervivencia**

La supervivencia de las células trasplantadas es necesaria para poder obtener una mejora clínica duradera. Numerosos factores asociados a los protocolos de manejo empleados afectan a la viabilidad celular, especialmente el mantenimiento y conservación del material vivo en cultivo o criopreservado. La mayor parte de las células degeneran por muerte celular apoptótica poco después de realizado el trasplante. El daño tisular que ocurre en el animal hospedador provoca una respuesta inflamatoria alrededor del implante y la secreción de citoquinas que también contribuye a la apoptosis de las células DAérgicas implantadas.

La supervivencia celular puede además verse comprometida tiempo después de hecho el implante debido a la reacción inmunológica desarrollada por el paciente. La expresión de moléculas antigénicas por parte de células trasplantadas distintas de las del hospedador es capaz de inducir la respuesta inmunológica y el rechazo del tejido trasplantado. Aunque el cerebro se ha considerado un órgano inmunoprivilegiado, presenta numerosas células microgliales responsables del reconocimiento antigénico, fagocitosis y respuestas inflamatoria (Muñoz et al., 2005). Estas células pueden verse activadas por el daño tisular producido por el trasplante y son capaces de reconocer como extraños los trasplantes intracerebrales y desencadenar el rechazo inmunológico del tejido fetal.

Los protocolos de diferenciación empleados para la diferenciación de ESC usan células de origen murino para dar soporte trófico a las humanas. La presencia de células de origen distinto al humano impide el uso de estas células troncales en terapia regenerativa.

- **Generación de tumores**

Las ESC expresan distintos genes que controlan el ciclo celular en distintos momentos. Sus niveles de expresión pueden ser modificados por las condiciones de cultivo, que pueden alterar la estabilidad de estos genes y conducir a la formación de teratomas. La presencia de células endodérmicas, mesodérmicas y sobre todo células indiferenciadas en los cuerpos embrioides puede originar tumores, y se ha indicado que la reducción o eliminación de estas células indiferenciadas es un requisito imprescindible para un uso seguro de estas células (Takahashi, 2007; Trzaska y Rameshwar, 2007).

Una técnica común para la obtención de líneas celulares inmortalizadas es la introducción de oncogenes en el genoma celular (Kim, 2007, Roybon et al., 2004). La expresión de estos genes puede estar regulada lo que permite mantener las células en estado quiescente, pero su uso clínico en terapia regenerativa es desaconsejable, y suelen ser empleadas encapsuladas en terapia génica.

- **Funcionalidad de las células del implante**

Un factor básico para una terapia regenerativa funcional es la producción de neuronas DA que sustituyan realmente a las neuronas de la SNpc, teniendo características como la capacidad de establecer conexiones sinápticas adecuadas (Burbach y Smidt, 2006). Las NSC están especificadas según la zona de la que se aíslan, viéndose en distintos estudios que la capacidad para replicarse y dar distintos fenotipos tiene una gran dependencia de su lugar de origen (Kim et al., 2006). Así, aunque se pueden obtener células inmunoreactivas para TH (TH-ir) de distintas

regiones del sistema nervioso, son las que derivan del mesencéfalo las que mayor capacidad de diferenciarse hacia el fenotipo dopaminérgico muestran, además de presentar las características neurofisiológicas propias de una neurona dopaminérgica mesencefálica del que células de otros orígenes carecen (Roybon et al., 2004; Storch et al., 2004). De modo parecido, las neuronas dopaminérgicas derivadas de ESC parecen ser relativamente ineficientes en terapia regenerativa para modelos animales de la EP (Abeliovich y Hammond, 2007). Esto sugiere que para la terapia celular en EP sea efectiva es necesaria la selección celular y/o la proliferación selectiva de los progenitores DAérgicos (Takahashi, 2007).

- **Problemas éticos derivados del uso de tejido procedente de abortos humanos**

El uso de tejido fetal procedente de embriones humanos ha sido un punto de intenso debate desde el punto de vista moral, religioso, legal y político. El balance entre beneficios y daños del uso de células procedentes de embriones cuyo desarrollo ha sido interrumpido (o bien por extracción de las células de la masa interna del blastocito o por el aborto del feto) es imposible de determinar objetivamente. Otras células troncales, como aquellas procedentes de individuos adultos (Young et al., 2005), pueden ser consideradas como una alternativa al uso de células de origen embrionario.

El uso de tejido procedente de otras especies, o de líneas celulares bien establecidas que no signifiquen emplear un embrión, ha sido propuesto como alternativa para aquellos estudios en los que el rechazo celular o la formación de tumores no constituyan limitaciones.

- **Riesgo infeccioso**

El uso de tejido procedente de donantes puede llevar consigo la transmisión de gran variedad de enfermedades infecciosas, por lo que las oportunas pruebas diagnósticas han de ser llevadas a cabo antes de realizar cualquier implante. También existe el riesgo de infección por virus silentes

insertados en el genoma como elementos génicos transponibles, organismos infecciosos aún no caracterizados o nuevos patógenos cuyas pruebas de detección no han sido todavía convenientemente desarrolladas.

La mejoría clínica obtenida con la terapia regenerativa dependerá de la correcta elección del tipo de célula que se empleará. Las NSC se han sugerido como candidatas ideales para terapia regenerativa y el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Arenas, 2002).

1.3- DESARROLLO DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

Numerosos protocolos de diferenciación de células troncales se han basado en conocimientos sobre la diferenciación de células en estadios equivalentes *in vivo* (Maxwell y Li, 2005; Trzaska y Rameshwar, 2007). El desarrollo del sistema nervioso central es un proceso complejo en el que factores genéticos y extracelulares actúan de forma orquestada para dar lugar a una estructura altamente organizada.

Las células dopaminérgicas del mesencéfalo se localizan y desarrollan en la parte ventral de la región cerebral que se extiende rostralmente hasta la zona del tálamo e hipotálamo, y llegan caudalmente hasta la unión del mesencéfalo con el romboencéfalo. Estas células se disponen en tres núcleos, el área retrorrubral (clásicamente denominado A8), la SNpc (A9) y el área tegmental ventral (A10). Basándose en criterios citológicos, topográficos y químicos se pueden subdividir a las células de la SNpc en cinco grupos que podrían estar relacionados con sus propiedades fisiológicas y susceptibilidad a la neurodegeneración. Además células dopaminérgicas de distinto origen difieren en el patrón de innervación que muestran al ser trasplantadas (Esposito, Di Matteo y Di Giovanni, 2007; Thompson et al., 2005).

Durante el desarrollo embrionario la diferenciación de las células dopaminérgicas es un proceso muy regulado. La combinación de factores intrínsecos de la propia célula y estímulos externos determinará no solamente el fenotipo de estas neuronas sino también su localización exacta dentro del sistema nervioso y las relaciones que forme con células vecinas. Por ello el entender cuáles son los factores que afectan a la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas *in vivo* no solo ayuda a entender como se regula su desarrollo sino que también sirve para sugerir posibles estrategias que podrían ayudar a obtener células DAérgicas en cantidades suficientes y con las características requeridas para favorecer la mejoría clínica de los pacientes de EP. Además se ha sugerido que los factores de transcripción encargados de la regulación del fenotipo DAérgico

podrían aportar claves para entender la patogénesis molecular de la EP (Alavian, Scholz y Simon, 2008).

La diferenciación de las células DA a partir de progenitores neurales se ha dividido en tres fases: especificación regional, diferenciación temprana y diferenciación tardía (Ang, 2006). Una vez que los progenitores adquieren competencia para poder diferenciarse en células del mesencéfalo debido a la acción combinada de moléculas señalizadoras, diversos factores de transcripción regularán de forma más precisa el desarrollo de estas células. La formación y la localización final de las neuronas dopaminérgicas vienen determinadas por la expresión secuencial de distintos factores de transcripción, que se pueden emplear como marcadores de los progenitores dopaminérgicos. Además permiten distinguir junto con otros marcadores entre progenitores dopaminérgicos, neuronas dopaminérgicas inmaduras y las neuronas ya maduras.

1.3.1- ESPECIFICACIÓN REGIONAL

Los primeros progenitores de células dopaminérgicas localizados se encuentran en la parte ventral del mesencéfalo alrededor de los 8 días en ratones, 9 días en ratas y a las seis semanas y media en humanos. En este estadio el único marcador del que disponemos para los progenitores DAérgicos es el enzima retinoaldehído deshidrogenasa (Raldh1) que se mantiene a lo largo del desarrollo. (Ang, 2006; Perrone-Capano y Di Porzio, 2000; Prakash y Wurst, 2006a; Prakash y Wurst, 2006b).

En 1998 se describe cómo se especifica la localización de los precursores dopaminérgicos y serotoninérgicos en el mesencéfalo en desarrollo (Ye et al., 1998). Parten de la hipótesis de que el tubo neural se comporta como una cuadrícula de coordenadas cartesianas en la que el fenotipo de cada una de sus partes viene determinado por su posición en esta cuadrícula. En este contexto hay señales que determinarán la posición en el eje dorso-ventral, mientras que otras la determinarán en el eje antero-posterior. Estas señales serían moléculas difusibles de carácter

soluble que forman gradientes de concentración denominadas morfógenos. Estas señales se originarían en zonas concretas del tubo nervioso, los centros señalizadores.

Aunque la posición exacta de los neuroblastos de los que se originan los precursores de neuronas dopaminérgicas de la SNpc no está claramente determinada, estas células se desarrollan próximas a dos centros señalizadores en mamíferos, la línea central ventral del tubo nervioso o placa basal o del piso y el límite rombo-mesencefálico u organizador ístmico. La placa basal se origina bajo la influencia de la proteína Sonic hedgehog (Shh) proveniente de la notocorda situada ventralmente al tubo nervioso en formación. Shh es una proteína muy conservada entre distintas especies, hallándose homólogos en insectos, anfibios, peces y aves. Puede actuar tanto ligada a la membrana de la célula en la que se produce como difundiendo tras ser procesada. Induce la expresión de la proteína HNF-3 β que precede y regula la expresión de Shh por las células de la propia placa basal. Shh actúa como factor ventralizante sobre el sistema nervioso siendo el responsable de la formación de un gradiente de concentración que determinara la organización en el eje dorso-ventral. La localización del organizador ístmico viene establecida por los dominios de expresión de Otx2 (rostral al organizador) y Gbx2 (caudal). El organizador ístmico confiere información posicional en el eje antero-posterior por medio del factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF-8, de sus siglas en inglés) (Prakash y Wurst, 2006a; Ye et al., 1998).

La inducción de las células DAérgicas requiere la señalización mediada por Shh y FGF-8. Cuando esta señalización viene precedida por la mediada por FGF-4, las células se diferencian hacia el fenotipo serotoninérgico (5-HTérgico) a expensas del fenotipo DAérgico (Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-Garcia, 2003; Ye et al., 1998). Otras moléculas como miembros de la familia de factores de crecimiento transformantes (TGF- α y TGF- β) y Wnt1 también están involucradas en la especificación regional de precursores DAérgicos y 5-HTérgicos (Prakash y Wurst, 2006b; Roussa y Krieglstein, 2004).

1.3.2- DIFERENCIACIÓN TEMPRANA

Entre los 9.5 y los 13.5 días de desarrollo embrionario (E9.5-E13.5) del ratón y entre E12 y E16 en rata los progenitores neurales salen del ciclo celular y forman neuronas postmitóticas inmaduras (Ang, 2006; Vitalis, Cases y Parnavelas, 2005). Estas células inician la expresión de nuevos factores de transcripción, y comienzan a migrar. El más destacado de los factores de transcripción implicados en el desarrollo de células DAérgicas es Nurr1, un receptor nuclear sin ligando conocido. Nurr 1 induciría la salida del ciclo celular de los precursores DAérgicos e iniciaría su diferenciación a neuronas maduras (Alavian, Scholz y Simon, 2008). También expresan factores de transcripción cuya expresión se inicia en los precursores y que se encargan del mantenimiento y supervivencia de las células DAérgicas a lo largo del desarrollo, como Limx1b y En1/2. Las células en diferenciación temprana comienzan expresar marcadores neuronales generales como la β -tubulina III. Estas células migran desde la zona donde se originaron hacia la localización definitiva que ocuparán en el mesencéfalo del individuo adulto. Se han propuesto distintas rutas de migración de las células desde el lugar de origen de los precursores hasta su localización final (Prakash y Wurst, 2006a; Smidt, Smits y Burbach, 2004).

1.3.3- DIFERENCIACIÓN TARDÍA

Las células continúan su migración al tiempo que van adquiriendo características propias de las células DAérgicas maduras. El inicio de la diferenciación tardía viene marcado por el inicio de expresión del enzima catecolaminérgico tirosina hidroxilasa (TH). Además expresan la AADC, lo que les permite sintetizar dopamina. Las células DAérgicas de la VTA y de la SNpc difieren en esta fase en el patrón de expresión de Pitx3: mientras que las de la SNpc expresan antes Pitx3 que el enzima TH, en las células que formarán el VTA la expresión de Pitx3 es posterior. En animales mutantes para Pitx3 se pierden las células de la SNpc mientras que las DAérgicas de la VTA continúan su desarrollo (Abeliovich y Hammond, 2007).

Las células DAérgicas comienzan a enviar axones al estriado antes de su diferenciación tardía. Diversos estudios sugieren que la interacción con células estriatales promueve la maduración de las células DAérgicas. El estriado es capaz de sintetizar factores neurotróficos como el GDNF, que pueden ser transportados retrógradamente al soma de las neuronas DA en la SNpc y favorecer la supervivencia de las neuronas que establecen los contactos sinápticos adecuados.

La diferenciación terminal y maduración de las neuronas DAérgicas de la SNpc incluye el establecimiento correcto de sus conexiones eferentes y de los circuitos aferentes que la regulan.

Las células DAérgicas maduras de la SNpc presentan toda la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de DA (TH, AADC), transportadores (VMAT2) que la llevan desde el citosol al interior de vesículas para su almacenamiento y posterior liberación a la hendidura sináptica, autoreceptores (D2) que regulan la síntesis, metabolismo y liberación de este neurotransmisor, así como transportadores (DAT) de alta afinidad capaces de recaptar la DA a través de la membrana tras la transmisión del impulso nervioso.

1.4- MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS DE INTERÉS PARA ESTA TESIS

Los neurotransmisores (NT) se han visto involucrados en la regulación de numerosos procesos que ocurren durante el desarrollo embrionario, previamente a su papel en la transmisión sináptica. Los NT son capaces de intervenir en procesos tan diversos como la proliferación de progenitores neurales, la migración celular, la diferenciación y maduración neuronal y la apoptosis (Du y Iacovitti, 1995; Guo et al., 2002; Riaz y Bradford, 2005; Riaz et al., 2004). Se cree que su papel señalizador durante el desarrollo es filogenéticamente anterior al de NT dentro del sistema nervioso, ya que se conserva entre distintos organismos. Debido a su aparición temprana y la proximidad en la localización de las células 5-HTérgicas y GABAérgicas respecto a los precursores DAérgicos, los NT en los que centramos nuestra atención son la serotonina y el GABA (Basu et al., 2008).

La serotonina es una molécula ampliamente distribuida por todo el organismo, siendo especialmente abundante en la sangre y el tracto gastrointestinal. De hecho se descubrió como un factor presente en el suero capaz de aumentar el tono vascular, de ahí el término serotonina. Posteriormente se halló en el sistema nervioso y se sugirió que podría actuar como neurotransmisor (Buznikov, Lambert y Lauder, 2001).

La síntesis de serotonina (5-HT) en vertebrados requiere el aminoácido triptófano procedente de la dieta. El triptófano es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por la triptófano hidroxilasa (TpH), enzima limitante de la síntesis localizada específicamente en neuronas 5-HTérgicas. Este producto es descarboxilado a 5-HT que será transportada al interior de vesículas hasta el momento de la transmisión sináptica. La serotonina puede ser recaptada de la hendidura sináptica por el transportador de serotonina (5-HTT) terminando así con la transmisión nerviosa. Intracelularmente

la serotonina será degradada por medio de la MAO y la aldehído-deshidrogenasa en pasos sucesivos.

GABA (ácido γ -amino butírico) es el principal neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso central. Fue identificado como neurotransmisor a mediados del siglo pasado y desde entonces se ha constatado su enorme importancia debido a su papel inhibidor. Es sintetizado en neuronas GABAérgicas a partir de glutamato, que puede ser obtenido a partir de glucosa en el ciclo de Krebs. Estas células poseen el enzima GAD, capaz de descarboxilar glutamato dando lugar a GABA. Tras su síntesis es transportado al interior de vesículas mediante el transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIATT)

Históricamente se han considerado tres tipos de receptores de GABA: GABA_A, receptor pentamérico ionotrópico, el GABA_B que está formado por dos subunidades distintas, GABA_{B1} y GABA_{B2} y es metabotrópico, y el GABA_C, que al igual que el GABA_A es pentamérico e ionotrópico. Las subunidades que componen el GABA_C, aunque diferentes de las presentes en los receptores GABA_A tienen cierta homología con estas, por lo que en la actualidad muchos autores consideran sólo dos tipos de receptores GABA, el GABA_A y el GABA_B, siendo el GABA_C un subtipo particular del tipo GABA_A.

Además de neurotransmisores hay otras moléculas encargadas de la señalización y la regulación de la neurogénesis. En esta tesis nos centraremos en un neuropéptido de creciente interés, la angiotensina, así como del ya mencionado Shh.

La angiotensina II (All) es una hormona peptídica conocida por su capacidad de regular el volumen sanguíneo y la resistencia vascular. Descubierta en el riñón, no se pudo aislar hasta mediados del siglo pasado, cuando empezó a denominarse angiotensina, como híbrido de los términos angiotonina e hipertensina usados hasta entonces. Posteriormente se determinó su secuencia peptídica así como su síntesis a partir de un precursor denominado angiotensinógeno,

la renina y el enzima conversor de angiotensina (ECA). El descubrimiento de que este mismo proceso generaba otros péptidos relacionados llevó a la denominación actual de angiotensina II para el octapéptido inicialmente descubierto, reservándose angiotensina I para el decapeptido usado como referencia para las demás formas. El conjunto de precursor, enzimas para su procesamiento, péptidos señalizadores y los receptores a través de los que señaliza se denomina sistema renina-angiotensina (RAS)

Se ha propuesto que el cerebro tiene su propio sistema renina-angiotensina. El cerebro es una de las dianas señalizadoras de la AII, con receptores capaces de responder a la estimulación mediada por esta hormona (Speth y Karamyan, 2008). El descubrimiento de que la barrera hematoencefálica impide la entrada de AII o sus precursores en el cerebro y que éste posee la maquinaria necesaria para sintetizar su propia AII sugirió la existencia de este RAS en el cerebro. Sólomente en los órganos circunventriculares, donde la barrera hematoencefálica está interrumpida, se comunican el RAS humoral y el cerebral.

Como ocurre con otras hormonas peptídicas se ha postulado que la AII actúa sobre receptores situados en la membrana plasmática de la célula diana. Hay dos receptores principales de angiotensina, denominados AT₁ y AT₂.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El uso de células progenitoras neurales como fuente de células dopaminérgicas tiene un gran interés para la terapia celular en la EP. A pesar de las grandes expectativas que se tienen debido a su potencial replicativo y de diferenciación, su uso clínico no está indicado debido a las limitaciones que presenta en la actualidad. Entre ellas cabe destacar el limitado número de células dopaminérgicas que es posible obtener in vitro y la variabilidad en la respuesta de estas una vez trasplantadas.

El conocimiento de los mecanismos implicados en la generación de células dopaminérgicas in vitro a partir de sus precursores mesencefálicos es clave para su uso en terapia celular de la EP.

Distintas moléculas que actúan como neurotransmisores en el sistema nervioso adulto de mamíferos como las monoaminas (a las que pertenecen la DA y la 5-HT), la acetilcolina y el GABA funcionan como moduladores del crecimiento en organismos filogenéticamente primitivos, en los que 5-HT y DA pueden jugar papeles diferentes pero complementarios (Buznikov, Lambert y Lauder, 2001; Lauder, 1993). En vertebrados los neurotransmisores pueden jugar papeles muy importantes durante la embriogénesis en la regulación de la proliferación, migración, diferenciación, morfogénesis y expresión génica mucho antes de su implicación en la transmisión sináptica (Buznikov, Lambert y Lauder, 2001; Nguyen et al., 2001).

Experimentos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran que en cultivos de progenitores mesencefálicos la eliminación de la población serotoninérgica induce un aumento significativo en la generación de células dopaminérgicas, (Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-Garcia, 2003). Sin embargo el mecanismo involucrado en la inhibición de la generación de células DAérgicas mediada por la serotonina no había sido aclarado. Por ello nos hemos propuesto investigar:

- Qué receptores de 5-HT podrían intervenir en la diferenciación de los progenitores mesencefálicos hacia el fenotipo dopaminérgico.
- El papel que los transportadores que se encargan de la internalización de 5-HT podrían tener en esta diferenciación.
- Qué tipos celulares intervienen en los procesos anteriores.

La aparición de células capaces de sintetizar GABA, la existencia de mecanismos de liberación de GABA y la presencia de receptores para este neurotransmisor en estadios tempranos del desarrollo sugiere que el GABA podría servir como factor trófico durante la neurogénesis (Barker et al., 1998; Varju et al., 2001). El efecto que el GABA tiene en el desarrollo de diversas poblaciones neuronales sugiere que podría tener también un papel activo en procesos ontogenéticos de células dopaminérgicas. Hemos estudiado:

- La relación de los receptores de GABA con el número de células DAérgicas obtenidas a partir de progenitores mesencefálicos en cultivo
- Cómo afecta el GABA a su proliferación, supervivencia y diferenciación.
- Los tipos celulares que mediarían la posible respuesta de los progenitores al GABA.

La Angiotensina II (Ang II) es un péptido conocido por su papel en la regulación de la presión sanguínea, el equilibrio hídrico/electrolítico y proliferación celular. Esta regulación, mediada a través de receptores AT_1 , sucede en animales adultos. Durante el desarrollo embrionario es el receptor AT_2 el que se encuentra expresado de forma más abundante, y su brusco descenso posterior sugiere un papel para este receptor en etapas tempranas de formación del sistema nervioso (Grady et al., 1991; Millan et al., 1991). Basándose en estudios in vitro se ha sugerido que podría actuar en la diferenciación y regeneración neuronal, especialmente en procesos de maduración y migración. Dado que su papel sobre progenitores mesencefálicos es desconocido, nos propusimos investigar:

- El efecto de la AII sobre el número de células DAérgicas obtenidas a partir de progenitores mesencefálicos y la posible mediación a través de receptores de este neuropéptido.
- Los procesos ontogenéticos (proliferación, apoptosis, diferenciación) y tipos celulares implicados en este efecto de la AII.

Shh es una proteína soluble señalizadora con efecto ventralizante en el sistema nervioso en desarrollo. Además se ha sugerido una acción mitogénica y promueve la diferenciación de células DAérgicas y 5-HTérgicas, así como la supervivencia de varios tipos celulares. Cuando se utiliza in vitro sus efectos varían en función de las células de las que se trate, y no siempre parece comportarse de la misma manera que in vivo. Sus efectos sobre la diferenciación de células DAérgicas son controvertidos. Es por ello que investigamos:

- El posible efecto que el bloqueo de la señalización mediada por Shh tiene sobre el tamaño de las poblaciones DAérgicas, 5-HTérgicas y GABAérgicas obtenidas a partir de neurosféricas de precursores mesencefálicos.
- Los posibles mecanismos involucrados usando un inhibidor de la señalización de Shh, la ciclopamina.

Hay pocos estudios en los que el uso de células DAérgicas generadas in vitro a partir de sus precursores conserven su funcionalidad y sean efectivas una vez trasplantadas en modelos animales de la EP. Los principales problemas en esta clase de trasplantes son la baja supervivencia de las células DAérgicas y la incapacidad de aportar respuestas funcionales adecuadas. Hemos estudiado:

- La supervivencia e integración de células DAérgicas obtenidas en cultivo a partir de neurosféricas de progenitores mesencefálicos tras ser implantadas en el estriado de modelos animales de EP, y la recuperación funcional de estos animales.

- La respuesta tras el implante de progenitores mesencefálicos tratados con anticuerpos anti-FGF-4, tratamiento que favorece la obtención de neuronas DAérgicas en cultivo, comparadas con tejido fetal primario mesencefálico.

En definitiva, tratamos de establecer metodologías útiles para la obtención eficaz de células DAérgicas a partir de neurosféricas procedentes de precursores mesencefálicos proliferados in vitro por medio de distintas aproximaciones, e investigar que factores afectan la respuesta de esta clase de células una vez trasplantadas en modelos animales de la EP.

MATERIAL Y MÉTODOS

3- MATERIAL Y MÉTODOS

Los métodos aparecen detallados en la sección correspondiente de los artículos que componen la tesis. Brevemente indicaremos algunos aspectos generales.

Todos los experimentos fueron realizados conforme a la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC) y aprobados por el correspondiente comité de la Universidad de Santiago de Compostela.

3.1- AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PRECURSORES MESENCEFÁLICOS

Los precursores mesencefálicos fueron obtenidos del tejido mesencefálico ventral a partir embriones de rata Sprague-Dawley de 12 ó 14 días de gestación. Este tejido fue disgregado química y mecánicamente, estimada su viabilidad y sembrado a una concentración de 5×10^5 células/ml de medio de cultivo con el suplemento B-27 y el mitógeno EGF para favorecer su proliferación durante una semana. Las neurosféricas formadas por la proliferación de los precursores fueron nuevamente disociadas mecánicamente y sembradas en medio de proliferación fresco. Tras dos semanas de proliferación las células son pasadas a placas recubiertas con polilisina y el medio cambiado a medio de diferenciación, sin B-27 ni EGF pero con un 10% de suero fetal bovino (FBS) Las células son tratadas (véase **Tabla 1** para tratamientos empleados) durante el periodo de diferenciación y comparadas con sus respectivos controles.

Tratamiento	Actividad
Metiotepina	Antagonista receptores 5-HT 1,2, 5,6,7
WAY 100635	Antagonista receptores 5-HT 1A
GR 127935	Antagonista receptores 5-HT 1B/1D
Ritanserina	Antagonista receptores 5-HT 2/7
Ondansetron	Antagonista receptores 5-HT 3
GR 113808	Antagonista receptores 5-HT 4
SB 258585	Antagonista receptores 5-HT 6
SB 269970	Antagonista receptores 5-HT 7
Zacopride	Agonista receptores 5-HT 4
8-OH-DPAT	Agonista receptores 5-HT 7/1A
5,7-DHT	Neurotoxina de células 5-HTérgicas
Fluoxetina	Inhibidor del transportador de 5-HT
GBR 12935	Inhibidor del transportador de DA
GABA	Agonista receptores GABA
Bicuculina	Antagonista receptores GABA A
CGP 55845	Antagonista receptores GABA B
CGP 54626	Antagonista receptores GABA B
Estricnina	Antagonista receptores Glicina
Angiotensina II (AII)	Agonista receptores AII
ZD 7155	Antagonista receptores AII AT1
PD 123319	Antagonista receptores AII AT2
5E1	Anticuerpo monoclonal anti-Shh
NS1	Medio condicionado línea mieloma ratón NS1
Ciclopamina	Alcaloide inhibidor Smoothened
Tomatidina	Alcaloide análogo ciclopamina, no inhibe Smoothened
Bromodeoxyuridina (BrdU)	Análogo de timidina, marcador de síntesis de ADN.
Citosina-β-D-arabinofuranósido (Ara-C)	Inhibidor de la progresión del ciclo celular, antimitótico

Tabla 1: Tratamiento farmacológico empleado en los precursores mesencefálicos durante el periodo de diferenciación

3.2- ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS NEURONAL

Para el estudio de la proliferación las células en cultivo fueron diferenciadas en presencia de BrdU, y la incorporación de BrdU evaluada mediante un anticuerpo específico (ver más adelante 3.5A-MARCADORES EMPLEADOS)

Para el estudio de la apoptosis las células fueron marcadas con bisbenzimidida y TUNEL. Las células fueron procesadas para inmunofluorescencia para TH para reconocer las células DAérgicas. Se empleo bisbenzimidida (Hoechst 33342) para teñir los núcleos de las células en cultivo, siendo identificadas las células apoptóticas por la condensación nuclear que ocurre en este

proceso. El TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labeling) emplea el enzima transferasa terminal de desoxinucleótidos para añadir dUTP marcados al extremo 3' del ADN, de forma que las células apoptóticas que sufren fragmentación del ADN pueden ser fácilmente reconocidas.

3.3- AISLAMIENTO ARN Y RT-PCR

Para evaluar el bloqueo con ciclopamina de la ruta canónica de Shh (ver 5- Discusión) se realizó RT-PCR a tiempo real para Gli1, cuya expresión está regulada por la propia ruta. El ARN fue extraído de las células en cultivo y cuantificado espectrofotométricamente. Mediante el enzima transcriptasa reversa y deoxinucleótidos se obtiene el ADN complementario al ARN extraído. Este ADN puede ser amplificado mediante PCR a tiempo real monitorizada mediante el empleo de SYBR Green, que se une al ADN de doble cadena de forma que emite fluorescencia en función de la cantidad de ADN de doble hebra que esté presente. Los cebadores fueron diseñados para amplificar Gli1 y β -actina, usada como control para normalizar la cantidad de ARN del que partimos. El método comparativo Ct fue utilizado para determinar los niveles relativos de expresión de ARN entre los tratamientos.

3.4- TRASPLANTES

3.4.1- LESIÓN 6-OHDA

Las ratas anestesiadas fueron lesionadas unilateralmente en el fascículo prosencefálico medial con 6-OHDA. Se usó desipramina media hora antes para evitar la captación de la neurotoxina por las terminales noradrenérgicas. La eficacia de la lesión fue evaluada en un rotómetro para asegurarnos que hubo una denervación máxima y que las ratas podían ser usadas para su manipulación posterior.

3.4.2- PREPARACIÓN CELULAS MESENCEFÁLICAS Y TRASPLANTE

Las ratas lesionadas fueron divididas en tres grupos. Al primero de ellos (grupo A) le fue practicada la cirugía de trasplante pero sólo recibió salino, siendo usado como control. El segundo recibió una suspensión celular obtenida directamente de mesencéfalo ventral fetal (Tejido fetal primario). Para el tercer grupo (grupo C) los precursores mesencefálicos fueron aislados y cultivados como neurosféricas proliferantes tal y como se describió previamente. Estas células fueron usadas para implantar, en la misma cantidad y concentración que las usadas en el grupo B tras dos días de diferenciación en medio suplementado con anticuerpos anti-FGF4.

3.4.3- PRUEBAS COMPORTAMENTALES

El comportamiento rotacional en respuesta a apomorfina y anfetamina fue evaluado mediante un rotómetro. La asimetría en la rotación fue expresada como la diferencia entre el número de vueltas completas hacia el lado contrario al de la lesión y el de vueltas hacia el lado contrario durante 90 (si inyectamos anfetamina) o 60 minutos (si inyectamos apomorfina). Estas pruebas fueron realizadas tras la lesión para conocer el grado de afectación de la vía nigroestriatal para la selección de animales a utilizar en estos experimentos, y tres meses tras del implante para evaluar el grado de recuperación conferido después del trasplante.

3.5- INMUNOMARCAJE

Los cultivos fueron fijados con paraformaldehído al 4% en DPBS. En los estudios *in vivo*, tras la última prueba comportamental, dos horas tras la inyección de anfetamina las ratas fueron sacrificadas por sobredosis de anestesia, perfundidas con paraformaldehído al 4% y los cerebros extraídos, crioprottegidos y seccionados en un microtomo de congelación, para poder llevar a cabo el inmunomarcaje del tejido así obtenido.

Se hizo inmunocitoquímica o inmunocitofluorescencia, simple o doble en función de los objetivos del experimento: Previo a la incubación con el anticuerpo primario las células fueron tratadas con una solución de agua oxigenada para inactivar la peroxidasa endógena en caso de ser necesario (inmunocitoquímica) y posteriormente se bloquearon los antígenos inespecíficos presentes en las células con suero normal de la misma especie que el

Antígeno	Especie	Tipo
TH	Ratón	Monoclonal
TH	Conejo	Policlonal
DAT	Conejo	Policlonal
TPH	Ratón	Monoclonal
AADC	Conejo	Policlonal
5-HT	Conejo	Policlonal
GABA	Conejo	Policlonal
β -Tub III	Ratón	Monoclonal
NeuN	Ratón	Monoclonal
GFAP	Ratón	Monoclonal
Fos	Conejo	Policlonal
BrdU	Ratón	Monoclonal
5-HT4	Conejo	Policlonal
5-HT7	Conejo	Policlonal
AT1	Conejo	Policlonal
AT2	Cabra	Policlonal
GABA α 3	Conejo	Policlonal
GABA β R1	Cobaya	Policlonal
Shh	Ratón	Monoclonal
FP4	Ratón	Monoclonal

Tabla 2: características de los anticuerpos empleados

anticuerpo secundario, con seroalbúmina bovina y Triton X100 para permeabilizar la membrana celular. Los anticuerpos primarios empleados en esta tesis vienen resumidos en la **Tabla 2**, incluyendo en la incubación el suero, la seroalbúmina y Triton. El anticuerpo secundario fue elegido teniendo en cuenta la especie de la que se obtuvieron los anticuerpos primarios, convenientemente marcado con biotina (inmunocitoquímica) o el fluoróforo de elección (inmunocitofluorescencia). Se empleó un preparado comercial de complejo avidina-biotina-peroxidasa o peroxidasa anti-peroxidasa (PAP). Para el revelado del marcaje inmunocitoquímico se empleó diaminobenzidina (DAB) en aquellos cultivos a los que se les realizó marcaje inmunocitoquímico. Para el marcaje de Fos se empleó junto con el DAB sulfato de níquel para obtener un precipitado color negro que se distingue del obtenido usando DAB solamente, de color marrón.

3.5.1- MARCADORES EMPLEADOS

Tirosina hidroxilasa (TH): Enzima citosólica que cataliza la hidroxilación de la L-tirosina a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Inicia la síntesis de catecolaminas, incluida la DA, en una reacción que es la limitante del proceso. El anticuerpo anti-TH sirve para identificar células catecolaminérgicas, siendo DAérgicas las únicas células que resultan marcadas en nuestros cultivos, tal y como se mostró mediante estudios con otros marcadores.

Transportador de dopamina (DAT): Proteína transmembrana encargada del transporte de la dopamina al interior de la neurona DAérgica. Es un marcador de neuronas y terminales DAérgicas.

Triptófano hidroxilasa (TPH): Enzima encargado de la hidroxilación del triptófano a 5-hidroxitriptófano (5-HTP), reacción inicial y limitante en el proceso de síntesis de 5-HT. El anticuerpo fue usado para la localización específica de células serotoninérgicas.

Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC): Enzima que cataliza la decarboxilación de los L-aminoácidos aromáticos. La decarboxilación de la L-DOPA y el 5-HTP es el último paso de la síntesis de la DA y la 5-HT, respectivamente. Se ha utilizado para marcar células DAérgicas y 5-HTérgicas, en las que es necesaria para la síntesis de los correspondientes neurotransmisores.

Serotonina (5-HT): Amina biogénica que funciona como neurotransmisor en el sistema nervioso. Sintetizada a partir del triptófano, en el sistema nervioso se localiza principalmente en células serotoninérgicas de los núcleos del rafe. Las células serotoninérgicas son capaces de sintetizarla, liberarla y recaptarla del espacio extracelular, siendo reconocidas por este anticuerpo.

Ácido gamma-amino butírico (GABA): Aminoácido que actúa como principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de vertebrados. Se sintetiza a partir del glutamato mediante la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). Las neuronas GABAérgicas son las células

que mayor concentración de este neurotransmisor presentan en cultivos, pudiendo ser identificadas mediante el marcaje con este anticuerpo.

β -tubulina isotipo III (β -Tub III): La tubulina es la unidad estructural de los microtúbulos, presentes en casi todas las células eucariotas. Este isotipo está presente en neuronas de mamíferos y sirve para identificarlas entre células indiferenciadas, astrocitos y oligodendrocitos.

Neuronal nuclei (NeuN): Proteína nuclear específica de neuronas, su presencia demostrada mediante el uso de anticuerpos permite distinguirlos de otros tipos celulares.

Proteína ácida fibrilar glial (GFAP): Filamento intermedio, el principal de los astrocitos maduros, siendo importante en la morfología y movilidad astrocítica. Es el marcador más específico para células de origen astrocítico.

Fos: Proteína sintetizada por el proto-oncogen *c-fos*, implicado en el crecimiento, diferenciación y desarrollo celular. Es inducido en respuesta a numerosos estímulos de forma rápida pero transitoria. Sirve para identificar a aquellas células capaces de reaccionar ante un determinado estímulo.

Bromodeoxiuridina (BrdU): Análogo pirimidínico de la timidina, incorporado selectivamente al ADN celular durante la fase S del ciclo celular. Se emplea para la identificación de síntesis de ADN en células siendo útil para conocer qué células están en división celular durante el periodo de exposición a la BrdU.

Receptor de serotonina tipo 4 (5-HT₄): Uno de los tipos en los que se han clasificado los receptores de serotonina. El anticuerpo sirve para su localización celular.

Receptor de serotonina tipo 7 (5-HT₇): Uno de los tipos en los que se han clasificado los receptores de serotonina. El anticuerpo sirve para su localización celular.

Receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁): Uno de los tipos en los que se han clasificado los receptores de Angiotensina II. El anticuerpo sirve para su localización celular.

Receptor de angiotensina tipo 2 (AT₂): Uno de los tipos en los que se han clasificado los receptores de Angiotensina II. El anticuerpo sirve para su localización celular.

Subunidad $\alpha 3$ del receptor de GABA A (GABA_A $\alpha 3$): Una de las subunidades presentes en receptores pentaméricos GABA_A. El anticuerpo sirve para la localización celular de este tipo de receptor.

Subunidad R1 del receptor de GABA B (GABA_BR1): Una de las subunidades presentes en los receptores heterodiméricos GABA_B. El anticuerpo sirve para la localización celular de este tipo de receptor.

Sonic hedgehog (Shh): Morfógeno implicado en la ventralización en el tubo nervioso y proliferación, supervivencia y diferenciación neurales. El anticuerpo puede neutralizar la molécula difusible inhibiendo su señalización. Mediante este anticuerpo podemos mostrar la presencia y localización de Shh.

Placa basal (FP): Estructura situada en la parte media ventral del tubo nervioso en desarrollo. El anticuerpo nos permite localizar las células procedentes de la placa basal no diferenciadas.

3.6- CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

En los estudios en cultivo las células fueron contadas manualmente mediante un microscopio invertido de contraste de fases o de epifluorescencia. Todos los experimentos fueron replicados al menos tres veces con cultivos distintos de precursores mesencefálicos. Para conocer el número de las células en las secciones a lo largo del implante se empleó un sistema no sesgado de estereología. El número total de células fue estimado a partir de los datos obtenidos mediante la fórmula del fraccionador óptico y el volumen del implante mediante el método de Cavalieri. Para los contajes se utilizó una magnificación 100x (cultivos) o 1000x (inmersión, tejido) sin tener conocimiento del tratamiento recibido. Las células fueron consideradas solo si la célula podía ser bien enfocada y cuando el marcaje era claro. La densidad óptica del estriado reinervado por el implante y de núcleos inmunoreactivos para Fos, así como el número de estos núcleos fue llevado a cabo por un programa de análisis de imagen a partir de fotografías tomadas de las secciones bajo condiciones controladas de iluminación.

Los resultados fueron normalizados con respecto a los obtenidos en un grupo control (en el caso de resultados en cultivos, este control fue obtenido a partir de células cultivadas al tiempo que los tratados para evitar la variabilidad presente entre distintos cultivos) y los resultados expresados en función de este grupo control. Los datos fueron analizados mediante un programa informático mediante un ANOVA de una vía, seguido del método de comparación múltiple de Tukey a posteriori.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1- La serotonina reduce la generación de neuronas dopaminérgicas a partir de precursores mesencefálicos a través de receptores de serotonina tipo 7 y tipo 4.

Parga J, Rodriguez-Pallares J, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2006) Serotonin decreases generation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via serotonin type 7 and type 4 receptors. J Neurobiol 67:10-22.

La serotonina (5-HT) es uno de los primeros sistemas de neurotransmisores que aparecen durante el desarrollo, teniendo un papel fundamental en la morfogénesis y maduración del sistema nervioso. Además las células serotoninérgicas y las dopaminérgicas mesencefálicas derivan de un precursor común, aunque el proceso que determina qué fenotipo acabará desarrollando no está del todo aclarado, y no se conocen los receptores y/o transportadores implicados en el efecto inhibitor de la 5-HT sobre la población dopaminérgica.

En este estudio tratamos de determinar los mecanismos a través de los cuales actúa la 5-HT, mediante el empleo de antagonistas específicos de distintos receptores o bien con bloqueadores del transportador de los neurotransmisores 5-HT y DA.

Para ello empleamos neurosféricas de células precursoras mesencefálicas obtenidas a partir de embriones de rata. Estas fueron cultivadas en presencia de un antagonista de receptores 5-HT de amplio espectro, la metiotepina, y se observó un aumento del número de células DAérgicas respecto al control. Sin embargo cuando las neurosféricas fueron tratadas con antagonistas más específicos el resultado fue muy dispar:

Antagonistas de los receptores 5-HT_{1B/1D} (GR127935), o de los receptores 5-HT₂ (Ritanserina) provocaron una disminución del número de células DAérgicas.

El bloqueo de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₃ o 5-HT₆ no supuso cambios en el número de células DAérgicas.

Por el contrario, en cultivos diferenciados en presencia de un antagonista del receptor 5-HT₄ (GR113808) o del receptor 5-HT₇ (SB269970) se observó un aumento en la generación de células DAérgicas. El antagonista de los receptores 5-HT₇ produjo también una reducción en el número de células serotoninérgicas obtenidas en cultivo.

Mediante inmunohistoquímica localizamos los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇ en células serotoninérgicas y gliales presentes en nuestros cultivos. Además agonistas de estos receptores fueron capaces de reducir el incremento en el número de células THs que induce el tratamiento con la neurotoxina serotoninérgica 5,7-DHT en los cultivos de precursores mesencefálicos. La reducción de la población glial dejó sin efecto sobre el número de células DAérgicas el tratamiento con antagonistas de estos receptores.

Tras el bloqueo mediante inhibidores del transportador de 5-HT, el de dopamina o ambos simultáneamente se observó una reducción significativa del número de células DAérgicas.

Serotonin Decreases Generation of Dopaminergic Neurons from Mesencephalic Precursors via Serotonin Type 7 and Type 4 Receptors

J. Parga, J. Rodriguez-Pallares, A. Muñoz, M. J. Guerra, and J. L. Labandeira-Garcia

Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology, Department of Morphological Sciences, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 28 December 2005; accepted 3 May 2006

ABSTRACT: Inductive signals mediating the differentiation of neural precursors into serotonergic (5-HT) or dopaminergic neurons have not been clarified. We have recently shown that in cell aggregates obtained from rat mesencephalic precursors, reduction of serotonin levels induces a marked increase in generation of dopaminergic neurons. In the present study we treated rat neurospheres with antagonists of the main subtypes of 5-HT receptors, 5-HT transport inhibitors, or 5-HT receptor agonists, and studied the effects on generation of dopaminergic neurons. Cultures treated with Methiothepin (5-HT_{1,2,5,6,7} receptor antagonist), the 5-HT₄ receptor antagonist GR113808, or the 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 showed a significant increase in generation of dopaminergic cells. Treatment with the 5-HT_{1B/1D} antagonist GR 127935, the 5-HT₂ antagonist Ritanserin, the 5-HT transporter inhibitor Fluoxetine, the dopamine and

norepinephrine transport inhibitor GBR 12935, or with both inhibitors together, or 5-HT₄ or 5-HT₇ receptor agonists induced significant decreases in generation of dopaminergic cells. Cultures treated with WAY100635 (5-HT_{1A} receptor antagonist), the 5-HT₃ receptor antagonist Ondasetron, or the 5-HT₆ receptor antagonist SB 258585 did not show any significant changes. Therefore, 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors are involved in the observed serotonin-induced decrease in generation of dopaminergic neurons from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors. 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors were found in astrocytes and serotonergic cells using double immunolabeling and laser confocal microscopy, and the glial receptors appeared to play a major role. © 2006 Wiley Periodicals, Inc. *J Neurobiol* 67: 10–22, 2007

Keywords: serotonin; dopamine; progenitor cells; serotonin receptors; Parkinson's disease

INTRODUCTION

There is increasing evidence that neurotransmitter signaling may be involved in early developmental events, some of which occur prior to synapse formation (Nguyen et al., 2001; Owens and Kriegstein, 2002). Serotonin (5-HT) is involved in early embryogenesis, even before neurons appear (Loric et al., 1995; Walther and Bader, 1999). 5-HT is one of the

first transmitters that appears during development, and is involved in proliferation and differentiation of 5-HT neurons, as well as many growth events in their target areas (Zhou et al., 2000; Buznikov et al., 2001; Branchereau et al., 2002; Suppress Pflieger et al., 2002). Data on the role of 5-HT in the differentiation and growth of dopamine (DA) neurons are contradictory (e.g., both stimulatory and inhibitory effects have been reported; Lauder et al., 1985; Liu and Lauder, 1992a,b; Azmitia, 2001; Witaker-Azmitia, 2001). Furthermore, it has been suggested that serotonergic and dopaminergic cells share a common precursor (Hynes et al., 1995; Mouillet-Richard et al., 2000). However, inductive signals that mediate the differentiation of neural precursors into 5-HT or DA neurons have not been clarified. Clarification of these

Correspondence to: J.L. Labandeira-Garcia (cmlaband@usc.es).

Contract grant sponsor: Galician Government (XUGA).

Contract grant sponsor: Spanish Ministry of Education (MEC).

© 2006 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 20 October 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/neu.20306

signals is highly relevant not only in understanding brain development but also in obtaining DA neurons for possible cell therapy in Parkinson's disease (Lindvall and Björklund, 2004; Winkler et al., 2005). In addition, clarification of the relationships between 5-HT and DA populations differentiated within the grafts may be relevant for understanding of L-dopa-induced dyskinesias observed in some grafted patients (Lopez et al., 2001; Freed et al., 2001; Muñoz et al., 2003; Olanow et al., 2003).

The search for alternative sources of DA neurons for grafting other than primary fetal tissue has become a major research topic. Precursor cells can be isolated from the embryonic mesencephalic flexure, where DA neurons are formed during normal development, and can proliferate in culture under serum-free conditions as floating neurospheres in response to mitogens such as epidermal growth factor (EGF). They spontaneously convert to neurons and glia following mitogen withdrawal, but rarely express the DA neuron phenotype. However, differentiation of precursor cells to DA neurons can be increased by different methodological approaches (Wang et al., 1995; Rodriguez-Pallares et al., 2001, 2004; Riaz et al., 2002). We have recently shown that in cell aggregates obtained from rat mesencephalic precursors, reduction of the number of 5-HT cells or serotonin levels induces a marked increase in generation of DA neurons in neurospheres (Rodriguez-Pallares et al., 2003, 2005). However, the mechanisms involved in the inhibitory effects of serotonin on generation of DA neurons from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors have not been clarified. Serotonin interacts with seven families of receptors with different and sometimes opposing functions in a variety of cellular and developmental processes (Mouillet-Richard et al., 2000; Branchereau et al., 2002; Rumajogee et al., 2004). It is known that 5-HT receptors are functional and capable of playing a role in neuronal development from very early stages of ontogenesis (Walther and Bader, 1999; Nguyen et al., 2001), although little is known about the receptors and mechanisms involved. Furthermore, the developmental actions of serotonin may not only be initiated through binding to a cell surface receptor but also through the regulation of intracellular 5-HT via serotonin transporter activity (Fanburg and Lee, 1997; Rumajogee et al., 2004).

The aim of the present study was to investigate which 5-HT receptors and/or 5-HT transporters are associated with the inhibitory effects of serotonin on generation of DA neurons from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors. We treated proliferating neurospheres with antagonists of the main subtypes of 5-HT receptors, 5-HT receptor agonists,

or 5-HT transport inhibitors, and studied the effects on generation of DA neurons. In addition, we investigated the location of receptors involved in the negative effects of 5-HT on generation of DA cells by double immunolabeling and laser confocal microscopy.

METHODS

Isolation and Culture of Mesencephalic Precursor Cells

Mesencephalic precursor cells were obtained from Sprague-Dawley rat embryos of 12 days of gestation (E12). All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), and approved by the corresponding committee at the University of Santiago de Compostela. Rats were deeply anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg). Ventral mesencephalic tissue was dissected from the embryos, and incubated in 0.1% trypsin (Sigma, St Louis, MO), 0.05% DNase (Sigma), and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Paisley, UK) for 20 min at 37°C. The tissue was rinsed in DNase/DMEM and mechanically dissociated. The resulting cell suspension was centrifuged at 50 g for 5 min, the supernatant was carefully removed, and the pellet resuspended in 0.05% DNase/DMEM to the final volume required. The number of viable cells in the suspension was estimated using acridine orange/ethidium bromide, and cells were plated onto 35 mm culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) at a density of 5×10^5 cells/mL. Cells were maintained in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂; 37°C). The proliferation medium was composed of HAMS F12/DMEM (1:3), B27 supplement (1:50; Gibco), and EGF (20 ng/mL; Sigma). After 7 days *in vitro*, cells formed floating clusters (i.e., cell aggregates) that were mechanically dissociated and seeded onto fresh EGF-containing medium, and maintained for another 7 days to purify the long-term propagating precursor cells and obtain a second generation of cell aggregates. After 2 weeks, neurospheres were gently triturated and plated onto culture dishes previously coated with poly-L-lysine (1 mg/mL; Sigma) in the absence of EGF. Cells from each batch of neurospheres were divided into control cultures (i.e., untreated; group A), and cultures subjected to different treatments at plating (groups B–E), and processed in the same culture batch as follows. In control cultures (group A), the neurospheres were seeded in a differentiation culture medium composed of HAMS F12/DMEM (1:1) and 10% fetal bovine serum (FBS; Biochrom KG, Berlin, Germany). Group B cells were plated onto the differentiation medium supplemented with antagonists of different 5-HT receptors (see below) in order to investigate the effects of the corresponding receptors on the differentiation of progenitors. Group C cultures were seeded in the presence of the selective 5-HT reuptake inhibitor Fluoxetine ((±)-*N*-methyl-g-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]benzenepropanamine hydrochloride, 10^{-5} – 10^{-7} M; Sigma) to study if the effects of 5-HT on generation of DA neurons occur through internalization of

5-HT by the 5-HT transporter. It has been reported that the dopamine transporter (DAT) may mediate 5-HT transport into neurons, therefore we also tested the effect of the dopamine and norepinephrine transport blocker GBR 12935 (1-[2-(diphenylmethoxy)ethyl]-4-(3-phenylpropyl)-piperazine dihydrochloride, 10^{-5} – 10^{-7} M; Sigma), as well as the effect of Fluoxetine + GBR 12935. Because group B experiments indicated that 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors were involved in the 5-HT-induced decrease in generation of DA neurons, group D cultures were treated with the serotonergic neurotoxin 5,7-DHT (5,7-dihydroxytryptamine creatinine sulfate, 10^{-5} M in sterile saline containing 0.2% ascorbic acid; Fluka, Buchs) to reduce endogenous 5-HT, and seeded in the presence of Zacopride hydrochloride (Zacopride, 5-HT₄ agonist/5-HT₃ antagonist; 10^{-5} – 10^{-7} M; Tocris) or [(±)-8-hydroxy-2-(diisopropylamino)tetralin hydrobromide (8-OH-DPAT; 5-HT_{7/1A} agonist; 10^{-7} – 5×10^{-7} M; Sigma) and WAY 100635 (5-HT_{1A} antagonist, see below). Given that 5-HT receptors that decreased generation of DA neurons were located in glial cells (i.e., 5-HT₇ and 5-HT₄ receptors, see below), group E cultures were seeded in the presence of 5-HT₇ or 5-HT₄ antagonists and a cell cycle inhibitor, the antimetabolic agent cytosine- β -D-arabinofuranoside, during the differentiation period (Ara-C, 1 μ M; 7 days; Sigma), or the same doses of Ara-C alone, to inhibit replication of non-neuronal cells, and to study if the effects of these antagonists are mediated by glial cells, given that the number of astrocytes (GFAP-ir cells, see below) is 10–15% of that observed in control cultures (see also Michel et al., 1997).

Treatments were added to the medium for an incubation period of 7 days (i.e., 7 days of treatment) and cells were maintained in cultures during 7 days *in vitro*. The range of concentrations of a specific antagonist, agonist, or transport blocker was chosen on the basis of the results of previous studies. When used in combination the doses of the drug were determined on the basis of the maximal response obtained from among the concentrations tested. The following 5-HT receptor antagonists were used: Methiothepin mesylate (Methiothepin, a 5-HT_{1,2,5,6,7} receptor antagonist, 10^{-5} – 10^{-7} M; Sigma); N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide maleate (WAY100635, potent and selective 5-HT_{1A} receptor antagonist, 10^{-6} – 10^{-8} M; Sigma); N-[4-methoxy-3-(4-methyl-1-piperazinyl)phenyl]-2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-1,1'-biphenyl-4-carboxamide hydrochloride (GR 127935, 5-HT_{1B/1D} antagonist, 10^{-5} – 10^{-7} M; Sigma); Ritanserin (5-HT_{2A/2B/2C/7} antagonist, 10^{-5} – 10^{-7} M; Sigma); Ondasetron hydrochloride (Ondasetron; 5-HT₃ antagonist, 10^{-5} – 10^{-6} M; Sigma); 1-methyl-1*H*-indole-3-carboxylic acid, [1-[2-[(methylsulfonyl)amino]ethyl]-4-piperidinyl]methyl ester (GR113808, selective 5-HT₄ receptor antagonist, 10^{-5} – 10^{-7} M; Tocris); 4-iodo-N-[4-methoxy-3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]benzene-sulfonamide (SB 258585, selective 5-HT₆ receptor antagonist, 10^{-5} – 10^{-7} M; Sigma); (2*R*)-1-[(3-hydroxyphenyl)sulfonyl]-2-[2-(4-methyl-1-piperidinyl)ethyl]pyrrolidine hydrochloride (SB 269970, selective 5-HT₇ receptor antagonist, 10^{-5} – 10^{-7} M; Tocris). Stock solutions of the antagonists (2×10^{-4} M, except WAY 100635 used at 2×10^{-5} M) were prepared in DMEM, filter sterilized,

divided into aliquots, and frozen. Aliquots were thawed immediately before use. As Ritanserin and Ondasetron required dilution in 10% methanol, additional control cultures containing methanol alone were used. Similarly, additional control cultures containing 0.2% ascorbate saline were used in groups treated with 5,7-DHT (group D cultures).

Immunolabeling

Cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; pH 7.4) for 20 min, and washed three times in DPBS. Cultures were preincubated with a blocking solution containing 10% normal serum in DPBS with 1% bovine serum albumin (DPBS-BSA) and 0.3% Triton X-100 (Sigma) for 1 h. The cultures were then incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal antityrosine hydroxylase antibody (TH; 1:30,000; Sigma) as a DA marker. Cultures were then washed and incubated for 1 h with the corresponding biotinylated secondary antibody (horse antimouse; Vector) diluted 1:500. After washing, cultures were incubated for 90 min with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC; 1:150; Vector). Finally, the labeling was revealed with 0.04% hydrogen peroxide and 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma). Given that 5-HT₇ and 5-HT₄ receptors were identified as those related to the 5-HT-induced decrease in generation of DA cells (see below), their effects on the serotonergic cell population were also tested. Cultures treated with 5-HT₄ or 5-HT₇ receptor antagonists were immunostained as above, using a rabbit polyclonal antiserum against 5-HT (1:7500; Incstar) or a mouse monoclonal antitryptophan hydroxylase antibody (TPH; 1:1000; Sigma) as markers of 5-HT cells, and the corresponding biotinylated secondary antibodies.

In addition, control cultures were processed for double immunofluorescence against 5-HT₇- or 5-HT₄-receptors and TH, TPH, or GFAP (glial fibrillary acidic protein, as a marker of astrocytes) to identify the 5-HT₄ or 5-HT₇ receptor-expressing cells. Representative cultures were also processed for double immunofluorescence against TH or 5-HT and DAT or TPH, as second DA or 5-HT markers to confirm the DA or 5-HT phenotype. Cultures were incubated overnight at 4°C using primary antibodies against TH (1:15,000), TPH (1:500), or GFAP (1:1000; Chemicon), containing 1% normal serum and 0.3% Triton X-100 diluted in DPBS-BSA. After rinsing with DPBS, the cultures were incubated for 180 min with the corresponding secondary antibodies conjugated with cyanine 3.18 (Cy3; 1:250; Chemicon). For the second labeling, cultures were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against 5-HT₄ (1:200; Chemicon), 5-HT₇ (1:160; Diasorin), 5-HT (1:4000; Incstar), or DAT (1:25; Chemicon). Cultures were washed and incubated with the corresponding secondary antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; 1:100; Chemicon). To visualize the fluorescent labeling, we used a laser confocal microscope (TCS-SP2; Leica, Heidelberg, Germany), and a sequential scanning method to avoid any possible overlap. In all experiments, the control cultures, in which primary antibody was omitted, were immunonegative for these markers.

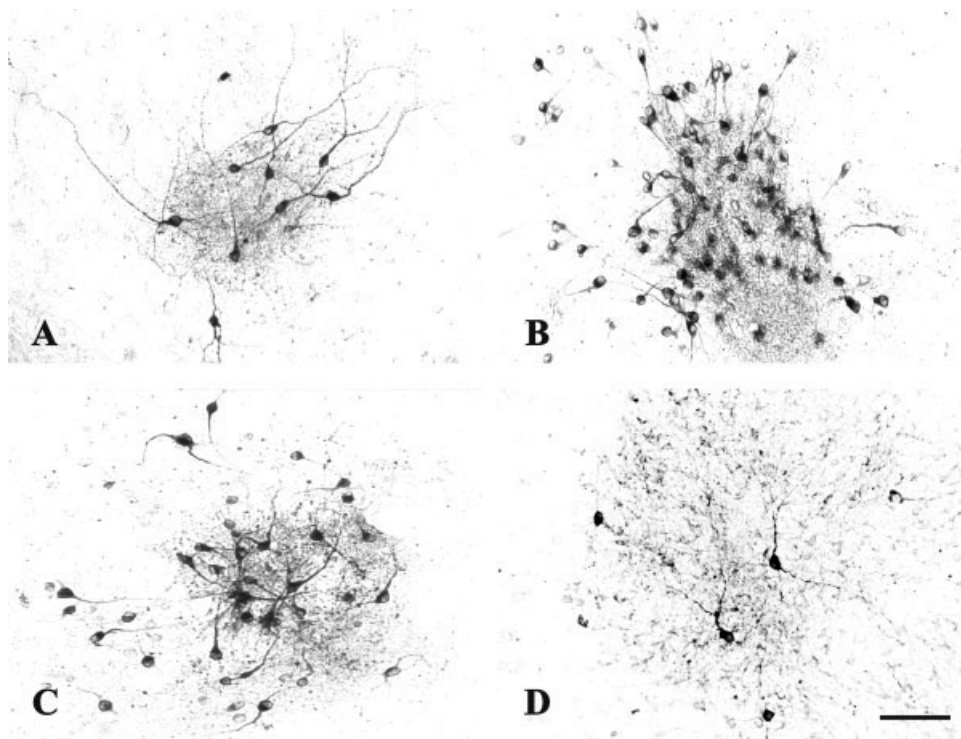


Figure 1 Microphotographs of dopaminergic (i.e., TH-ir) neurons differentiated from aggregates of mesencephalic precursor cells. Cultures of precursor cells treated with the 5-HT₇ receptor antagonist SB269970 (B) or the 5-HT₄ receptor antagonist GR113808 (C) contained more TH-ir cells than the nontreated control cell cultures (A). However, cultures treated with the 5-HT_{1B/1D} antagonist GR127935 showed a significant decrease in the number of TH-ir cells (D). Scale bar = 100 μ m.

Quantification and Data Analysis

Cells were always counted by the same investigator who was unaware of the treatment history and using phase contrast or epi-fluorescence microscopy (Nikon's Eclipse inverted microscope, Tokyo, Japan) at 100X magnification. In each experiment, we counted 15 culture dishes and 15 randomly chosen cell aggregates per dish. A few culture dishes that did not contain at least 15 aggregates were excluded from counting. In each cell aggregate, we estimated the number of DA or 5-HT cells by focusing down through the aggregate and counting all immunoreactive cells that came into focus. Thus, 1264 ± 146 TH-ir cells were counted by experiment in a control group. All experiments were replicated at least three times using new groups of EGF-responsive mesencephalic precursor cells. The results were normalized to the counts of the control-group of the same batch (i.e., expressed as a percentage of the control-group counts) to counteract any possible variation from one batch to another. Statistical differences between groups (mean \pm SEM) were tested using one-way ANOVA followed by posthoc Tukey test ($p < 0.05$). Normality of populations and homogeneity of variances were tested before each ANOVA. Statistical analysis was performed using SigmaStat 2.0 from Jandel Scientific (San Rafael, CA).

RESULTS

Effect of 5-HT Receptor Antagonists and 5-HT and/or DA Transporter Inhibition on Generation of TH-ir Cells from Neurospheres of Mesencephalic Precursor Cells

Differentiation of the mesencephalic precursors was initiated by removal of the mitogen and addition of FBS. After 7 days, cells differentiated from the proliferating neurospheres showed different morphologies. Most cells appeared as differentiated neurons or glia. However, numerous cells of undifferentiated morphology (i.e., rounded cell bodies without processes) were still present in the aggregates. Most TH-ir cells appeared as mature neurons with long and branching processes, and only a few had immature appearance (Fig. 1). Immunoreactivity for DAT was also observed in TH-ir neurons using double immunolabeling and laser confocal microscopy, and immunoreactivity for TPH was also observed in 5-HT-ir cells, which confirmed the dopaminergic and serotonergic phenotypes, respectively (not shown, see Rodriguez-Pallares et al., 2003, 2004).

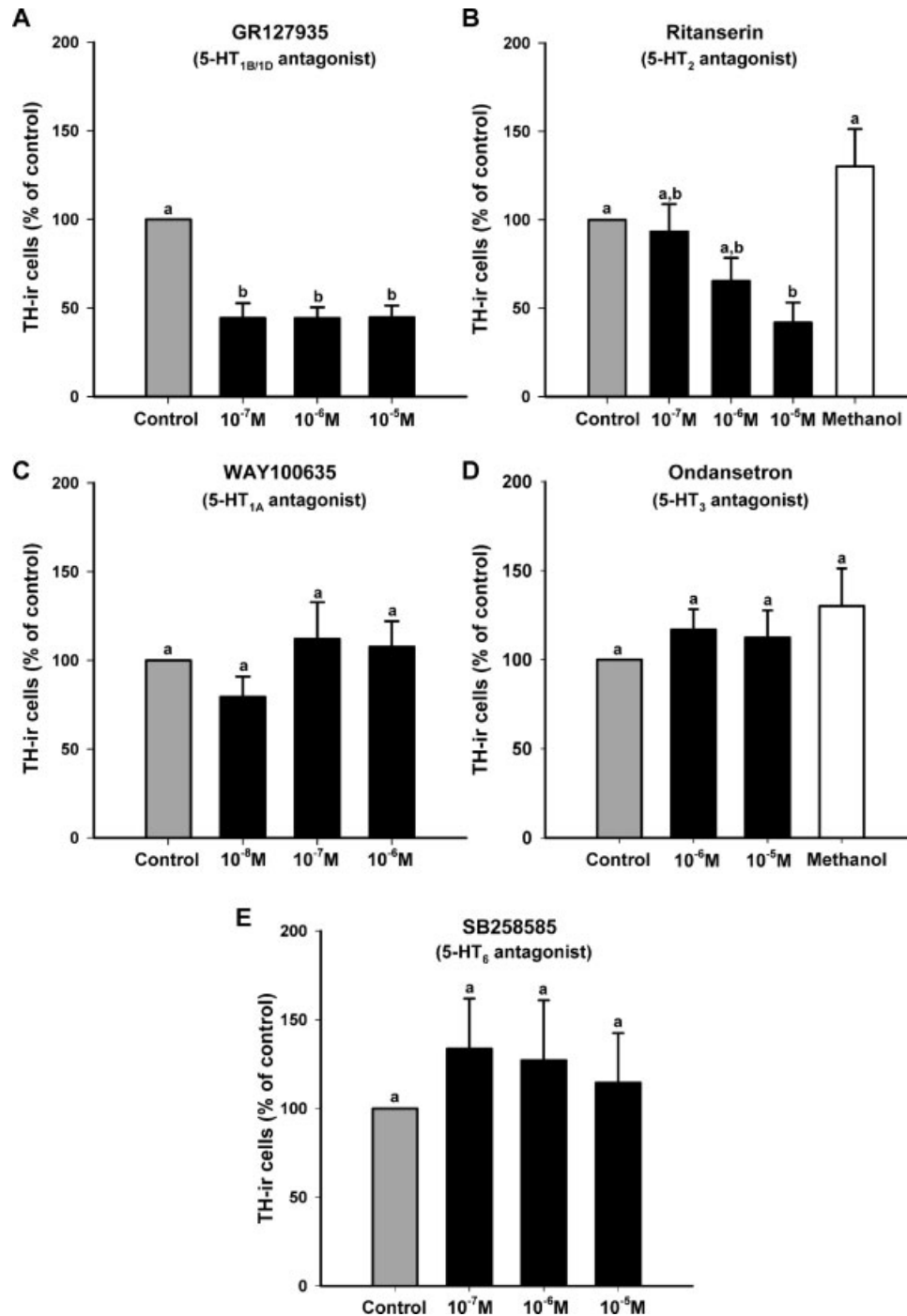
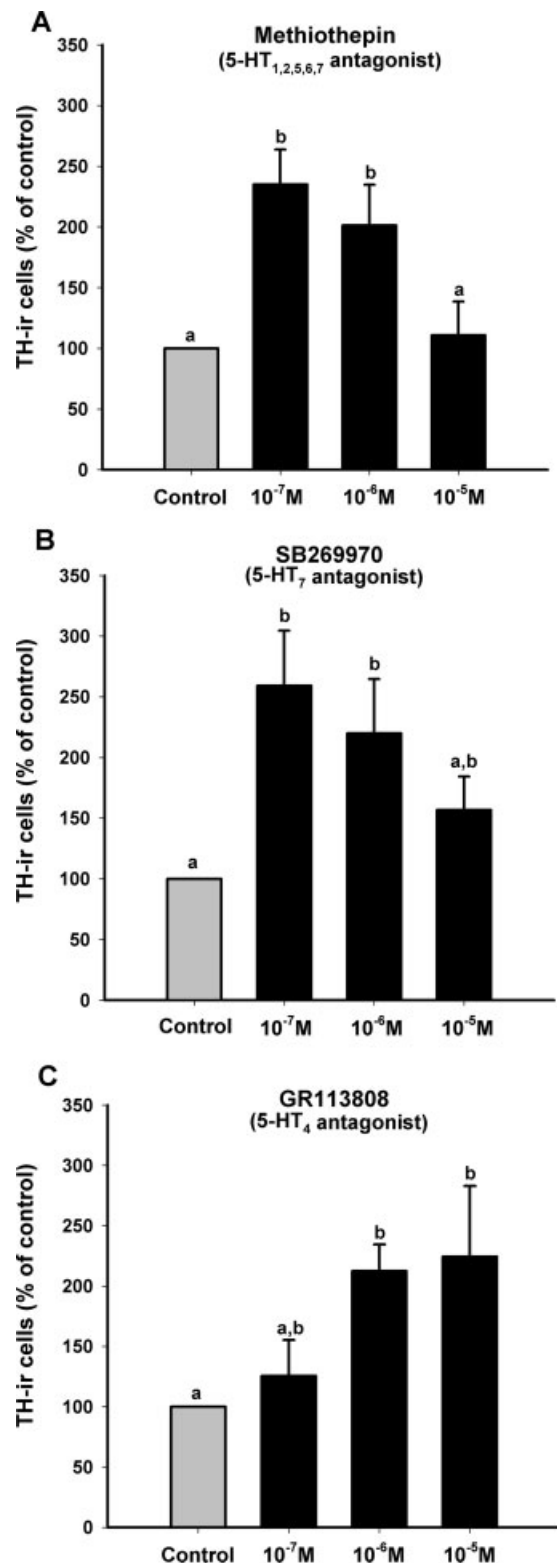


Figure 2 Effects of treatment with different doses of 5-HT antagonists on the number of TH-ir cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. The generation of TH-ir cells was reduced by treatment with 5-HT_{1B/1D} [GR 127935; (A)] or 5-HT₂ [Ritsanserin; (B)] receptor antagonists, but was not significantly affected by treatment with 5-HT_{1A} (WAY 100635), 5-HT₃ (Ondansetron), or 5-HT₆ (SB 258585) receptor antagonists (C–E). Additional control cultures containing 10% methanol (i.e., vehicle) were included in (B) and (D). The data are expressed as percentages of the number of TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that differ significantly are indicated by a different letter ($p < 0.05$, one-way ANOVA and posthoc Tukey tests).

Cultures treated for 7 days with Methiothepin (5-HT_{1,2,5,6,7} receptor antagonist) showed significantly more TH-ir cells than the controls (group A). This effect was maximal at doses of 10⁻⁷ M (about 240%



of controls). However, the results obtained after treating the neurospheres with more selective antagonists were different (Figs. 1–3). Cultures treated with WAY100635 (potent and selective 5-HT_{1A} receptor antagonist) did not show any significant change in the number of TH-ir neurons generated in the neurospheres [Fig. 2(C)]. Treatment with the 5-HT_{1B/1D} antagonist GR 127935 induced a significant decrease in generation of TH-ir cells in the neurospheres (approximately 45% of controls), and a similar decrease (approximately 35% of controls) was observed in cultures treated with the 5-HT₂ antagonist Ritanserin [Figs. 1(D) and 2(A,B)]. Treatment with the selective 5-HT₃ receptor antagonist Ondasetron or with the selective 5-HT₆ receptor antagonist SB 258585 did not induce any significant change in the number of TH-ir cells observed in the neurospheres [Fig. 2(D,E)]. However, cultures treated with the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 or the selective 5-HT₄ receptor antagonist GR113808 showed a significant increase in generation of TH-ir neurons [about 260 and 225% of controls, respectively; Figs. 1(B,C) and 3].

Cultures treated with the 5-HT transporter inhibitor Fluoxetine showed a significant reduction in the number of TH-ir neurons [Fig. 4(A)], and treatment with the dopamine and norepinephrine transport blocker GBR 12935 induced a similar reduction in generation of TH-ir neurons from the proliferating neurospheres [Fig. 4(B)]. Finally, simultaneous treatment with Fluoxetine and GBR 12935 induced a marked decrease in generation of TH-ir neurons [Fig. 4(C)].

Effect of 5-HT₇ and 5-HT₄ Receptor Agonists on Generation of TH-ir Cells

The results obtained with 5-HT₇ and 5HT₄ receptor antagonists were confirmed by using 5-HT₇ and 5HT₄ receptor agonists in cultures treated with the serotonergic neurotoxin 5,7-DHT to reduce the levels of endogenous 5-HT. In addition, the 5-HT_{1A/7} agonist 8-OH-DPAT was used in the presence of the 5-HT_{1A} antagonist WAY100635. Cultures treated with 5,7-DHT showed a

Figure 3 Effects of treatment with different doses of 5-HT antagonists on the number of TH-ir cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. The generation of TH-ir cells was increased by treatment with Methiothepin [5-HT_{1,2,5,6,7} antagonist; (A)], SB 269970 [5-HT₇ receptor antagonist; (B)], or GR 113808 [5-HT₄ receptor antagonist; (C)]. The data are expressed as percentages of the number of TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that differ significantly are indicated by a different letter ($p < 0.05$, one-way ANOVA and posthoc Tukey tests).

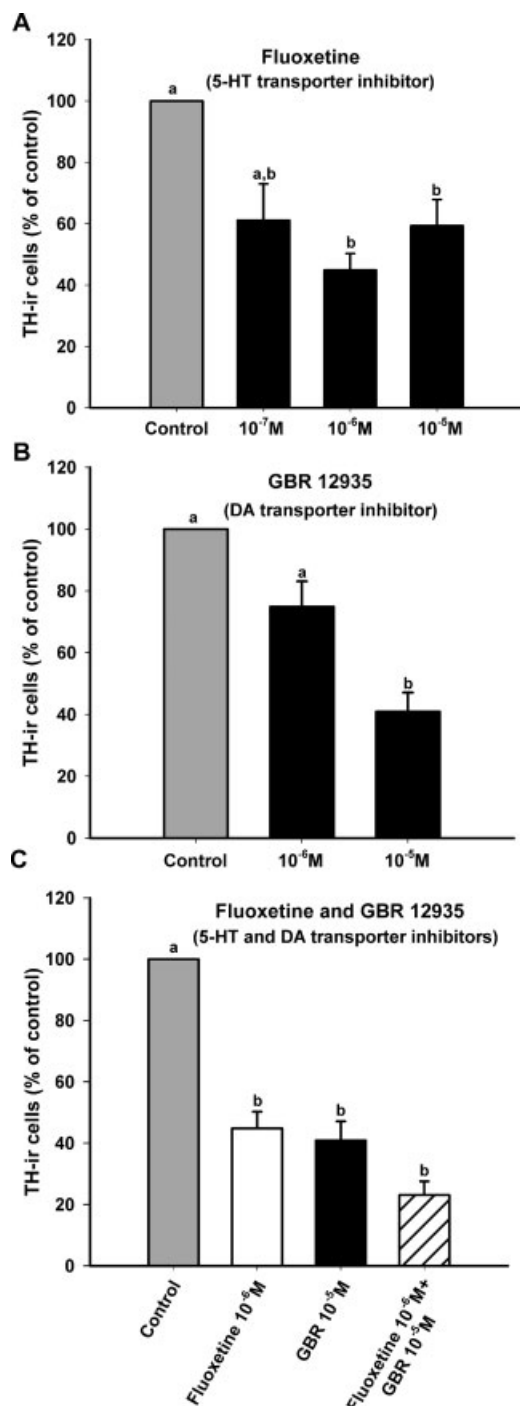


Figure 4 Treatment with different doses of the 5-HT transporter inhibitor Fluoxetine (A), the dopamine and nor-epinephrine transporter inhibitor GBR 12935 (B), or Fluoxetine + GBR 12935 significantly decreased the number of TH-ir cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. The data are expressed as percentages of the number of TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that differ significantly are indicated by a different letter ($p < 0.05$, one-way ANOVA and posthoc Tukey tests).

marked increase in generation of TH-ir cells. However, the 5,7-DHT-induced increase in TH-ir cells was significantly reduced by simultaneous treatment with the 5-HT₄ or 5-HT₇ agonist (Fig. 5).

Effect of 5-HT₇ and 5-HT₄ Receptor Antagonists on the Serotonergic Population

Because 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors appeared to be involved in serotonin-induced decrease in generation of DA neurons, we also studied the effects of treatment with the selective 5-HT₄ receptor antagonist GR113808 and with the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 on the generation of 5-HT neurons. Neurospheres treated with the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 showed a significant decrease in the number of 5-HT cells with respect to controls ($68 \pm 6\%$). Treatment with the 5-HT₄ receptor antagonist GR113808 resulted in a nonsignificant decrease in the number of 5-HT cells with respect to controls ($89 \pm 5\%$).

Location of 5-HT₇ and 5-HT₄ Receptors

The location of 5-HT₇ and 5HT₄ receptors was studied using double immunolabeling and laser confocal microscopy (Fig. 6). Double immunolabeling for 5-HT₇ and GFAP or TPH revealed that 5-HT₇ receptors were located in astrocytes and 5-HT cells. However, we did not observe double labeling for 5-HT₇ and TH, suggesting that these receptors are not located in DA neurons. Similarly, double immunolabeling for 5-HT₄ and GFAP or TPH revealed that 5-HT₄ receptors were located in astrocytes and 5-HT cells. Most TH-ir cells did not express 5-HT₄ immunoreactivity. However, a few TH-ir cells were also immunoreactive for 5-HT₄.

Because 5-HT₇ and 5-HT₄ receptors were located in glial cells, group E cultures were seeded in the presence of 5-HT₇ or 5-HT₄ antagonists and the antimetabolic agent Ara-C to inhibit replication of non-neuronal cells. Treatment with Ara-C during the differentiation period prevented the 5-HT₇ or 5-HT₄ antagonist-induced increase in generation of TH-ir neurons, indicating that glial 5-HT₇ or 5-HT₄ receptors played an important role in the negative effect of serotonin on generation of DA cells in the proliferating neurospheres (Fig. 7).

DISCUSSION

In the present study, we investigated the 5-HT receptors and/or transporters involved in the inhibitory effects of serotonin on generation of dopaminergic neurons from proliferating neurospheres of mesence-

phalic precursors. We previously observed an important increase in the number DA cells after inducing partial elimination of the 5-HT neurons with the serotonergic toxin 5,7-DHT, or after reducing 5-HT levels with the 5-HT synthesis inhibitor DL-p-chlorophenylalanine (pCPA; Rodriguez-Pallares et al., 2003). In addition to the 5-HT released by serotonergic cells, it is known that there is also a low 5-HT content in the FBS used in the differentiation medium, which may contribute to stimulation of 5-HT receptors. However, the results of several experiments suggest that

the 5-HT content in FBS is below the usual effective levels (Zhou and Iacovitti, 2000; Riaz et al., 2004).

According to effects observed after reducing the levels of 5-HT (Rodriguez-Pallares et al., 2003), antagonists affecting most subtypes of 5-HT receptors, such as Methiothepin (5-HT_{1A,1B,1D,2A,2C,5A,5B,6,7} antagonist), induced an increase in the number of TH-positive cells generated in the neurospheres. However, the results obtained after treating the neurospheres with more selective antagonists were different. Treatment with the 1B/1D receptor antagonist GR127935 induced a significant decrease in the number of DA phenotype neurons generated in the neurospheres, suggesting that stimulation of these receptors may potentiate the DA phenotype. The results of several recent studies suggest that in very early stages of development 5-HT_{1B/1D} and 5-HT_{1A} receptors may act as 5-HT autoreceptors, so that 5-HT synthesis, storage, and uptake may be down-regulated by 5-HT itself (Héry et al., 1999; Mouillet-Richard et al., 2000; Roberts et al., 2001; Rumajogee et al., 2004). It has been suggested that 5-HT_{1B} autoreceptors diminish 5-HT release from axon terminals and varicosities (Galzin et al., 1992), while 5-HT_{1A} autoreceptors inhibit firing of serotonergic neurons (Sprouse and Aghanian, 1987; Héry et al., 1999; Azmitia, 2001). Furthermore, it has recently been observed that the lack of 5-HT_{1B} or 5-HT_{1A} receptors is associated with a significant increase in the number of serotonergic neurons in primary cultures from embryonic raphe (Rumajogee et al., 2004). Therefore, treatment with 5-HT_{1B/D} antagonists may increase 5-HT release in neurospheres, which through other 5-HT receptors (i.e., glial 5-HT₄, 5-HT₇ receptors, see below) may decrease generation of DA neurons. However, it has also been reported that glial 5-HT_{1A} receptors promote the growth of 5-HT neu-

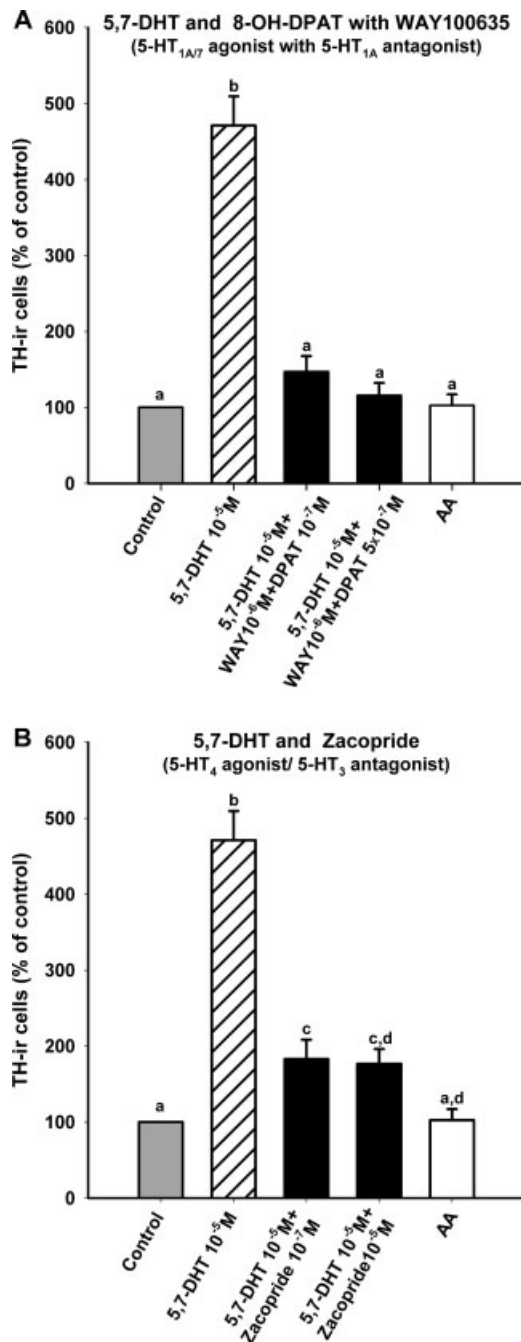


Figure 5 Effects of treatment with different doses of 5-HT₄ or 5-HT₇ agonists on the number of TH-ir cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. Cultures were treated with the serotonergic neurotoxin 5,7-DHT (in 0.2% ascorbic acid, AA) to reduce endogenous 5-HT, which induced a marked increase in generation of TH-ir cells. The 5,7-DHT-induced increase in TH-ir cells was significantly reduced by simultaneous treatment with the 5-HT₄ agonist/5-HT₃ antagonist Zacopride or with the 5-HT_{7/1A} agonist 8-OH-DPAT in the presence of WAY100635 (5-HT_{1A} antagonist). Additional control cultures containing vehicle (0.2% ascorbate saline, AA) were also included. The data are expressed as percentages of the number of TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that differ significantly are indicated by a different letter ($p < 0.05$, one-way ANOVA and posthoc Tukey tests).

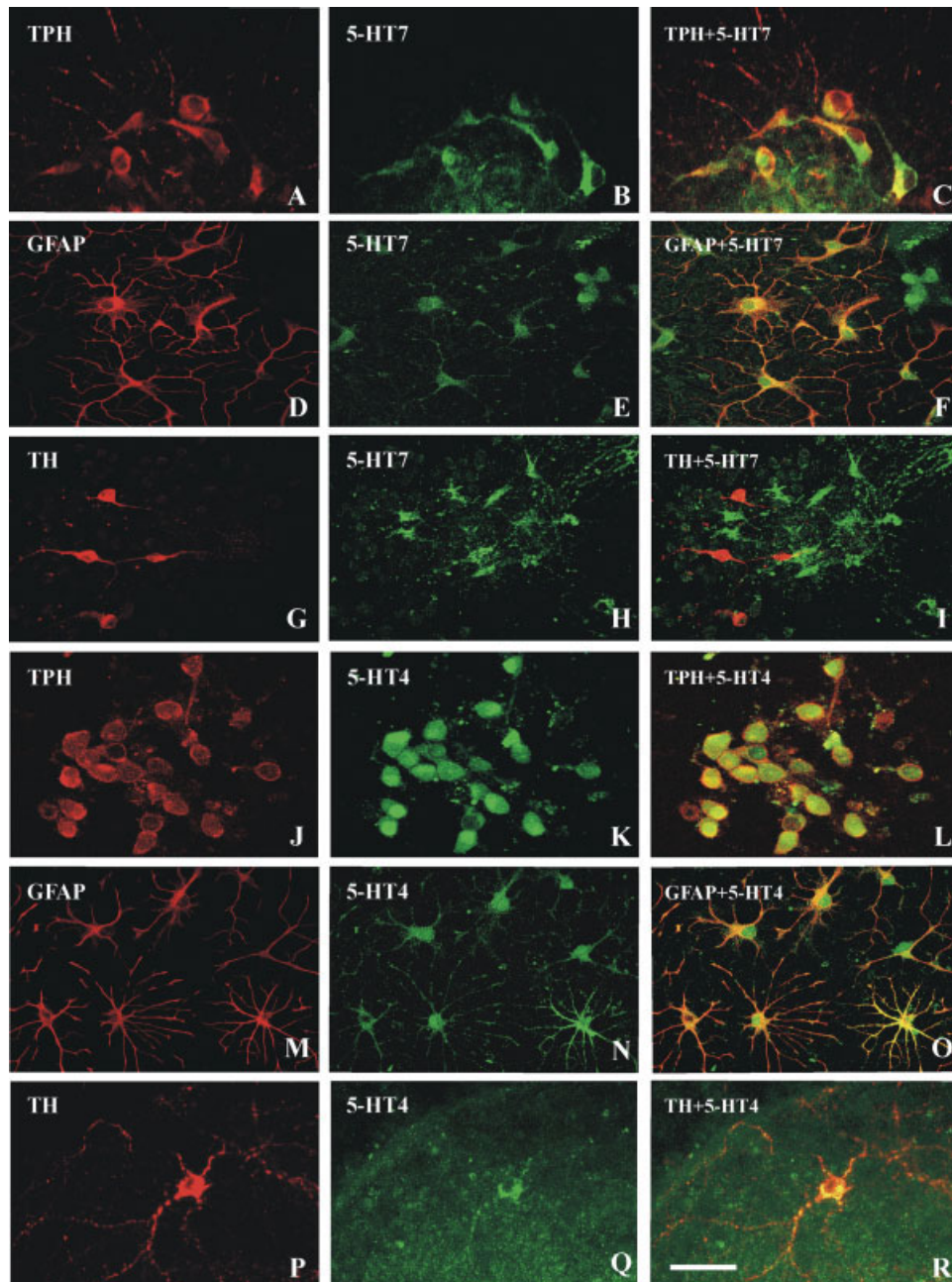


Figure 6 Double fluorescent labeling for the serotonergic marker tryptophan hydroxylase [TPH (A,J)], the astroglial marker glial fibrillary acidic protein [GFAP (D,M)], or the dopaminergic marker tyrosine hydroxylase [TH (G,P)] and 5-HT₇ (B,E,H) or 5-HT₄ (K,N,Q) receptors, observed by confocal laser scanning microscopy in control neurospheres differentiated from mesencephalic precursors. Cells labeled for TPH (C,L) or GFAP (F,O) were also immunoreactive for 5-HT₇ (C,F) and 5-HT₄ (L,O). We did not observe colocalization of TH-ir and 5-HT₇-ir (I), and colocalization of TH-ir and 5-HT₄-ir (R) was observed only in a few cells. Scale bar: 40 μ m in (A–C), (J–L), and (P–R), 50 μ m in (D–F) and (M–O), 75 μ m in (G–I).

rons (Whitaker-Azmitia, 1991; see below). In the present experiments, treatment with the 5-HT_{1A} antagonist WAY100635 did not induce significant changes in the number of DA neurons.

Treatment with the 5-HT₂ receptor antagonist Ritanerol also induced a significant decrease in the DA phenotype neurons generated in neurospheres, suggesting that stimulation of these receptors may increase

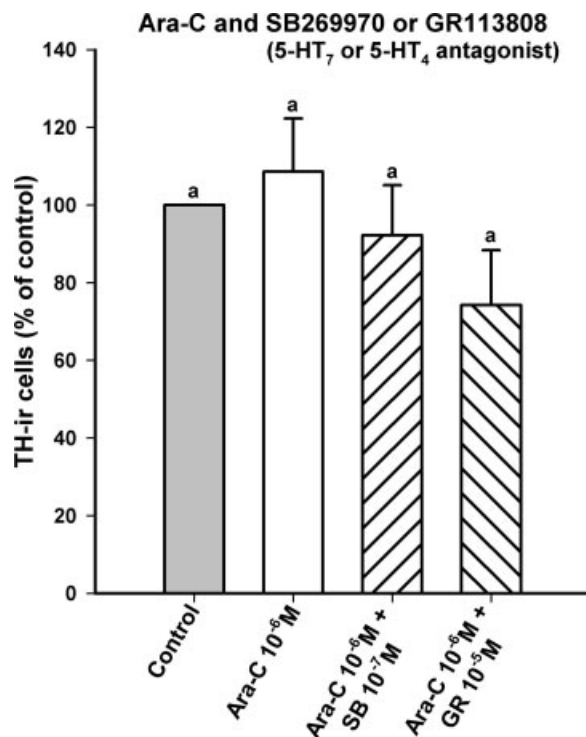


Figure 7 Effects of treatment with the 5-HT₇ receptor antagonist (SB269970), the 5-HT₄ receptor antagonist (GR 113808), and/or the antimitotic agent cytosine- β -D-arabino-furanoside (Ara-C) on the number of TH-ir cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. Treatment with Ara-C counteracted the increase in generation of TH-ir cells observed after treatment with 5-HT₇ or 5-HT₄ receptor antagonists. The data are expressed as percentages of the number of TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that do not differ significantly are indicated by the same letter ($p < 0.05$, one-way ANOVA and posthoc Tukey tests).

generation of DA neurons. A developmental role for 5-HT₂ receptors has been reported in several studies, with the role of 5-HT_{2B} being particularly interesting during early embryonic development (Gaspar et al., 2003). Data obtained with the clone 1C11 (Loric et al., 1995; Mouillet-Richard et al., 2000), immortalized 5-HT precursors (Jackson et al., 1997), and rat brain (Bonaventure et al., 2002) suggest that 5-HT_{2B} may be an autoreceptor. However, additional research is necessary to clarify the role of 5-HT₂ receptors in neural development. If 5-HT₂ receptors behave as autoreceptors, treatment with Ritanserin may increase 5-HT release in neurospheres, which, through stimulation of other 5-HT receptors such as glial 5-HT₇ and 5-HT₄ (see below), may decrease generation of DA neurons. In addition to its effect on 5-HT₂ receptors, Ritanserin is also a 5-HT₇ antagonist. However, the affinity for 5-HT₂ receptors is much higher than for 5-HT₇ receptors

(Hoyer et al., 1993; Krobert et al., 2001). Any possible effect on 5-HT₇ receptors (i.e., increase in generation of TH-ir cells) may therefore be counteracted by the effect on 5-HT₂ receptors (i.e., decrease in generation of TH-ir cells).

5-HT receptors represent one of the most complex families of neurotransmitter receptors. However, all 5-HT receptors belong to the G-protein-coupled receptor superfamily, with the exception of the 5-HT₃ receptor, which is a ligand-gated ion channel (Raymond et al., 2001; Hoyer et al., 2002). The possibility that 5-HT₃ receptors are involved in the negative effects of 5-HT on the generation of DA neurons was tested in the present experiments. However, no significant changes were observed after treatment with 5-HT₃ receptor antagonists. Serotonin type 5 receptors were not studied in the present experiments. They have been referred to as one of the "orphan" 5-HT receptors because so little is known about them, and they have not yet been demonstrated to "function" in native systems (Hoyer et al., 2002; Glennon, 2003). Furthermore, no reliable 5-HT₅-selective agonists or antagonists are available.

5-HT receptors type 4, 6, and 7 share a common transduction signal. They are coupled to the activation of AC, causing increased intracellular levels of cyclic AMP (cAMP). They have been less extensively investigated than other 5-HT receptors, and much less is known about them, particularly their possible role in neuronal development (Raymond et al., 2001; Hoyer et al., 2002; Glennon, 2003; Hedlund and Sutcliffe, 2004). However, there is increasing evidence of the significant role of these receptors in brain development (Waeber et al., 1996; Jackson et al., 1997; Beique et al., 2004). In the present study, treatment with 5-HT₄ or 5-HT₇ antagonists induced a significant increase in the generation of DA neurons in neurospheres, and treatment with 5-HT₄ or 5-HT₇ agonists blocked the 5,7-DHT-induced increase in generation of DA cells. This suggests that 5-HT₄ or 5-HT₇ receptors are involved in the increase in generation of DA neurons observed after elimination of the 5-HT neurons or reduction of 5-HT levels (Rodriguez-Pallares et al., 2003), and that 5-HT inhibits the generation of DA neurons in the neurospheres through 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors. No significant changes were observed, however, after treatment with the 5-HT₆ receptor antagonist SB258585. The negative effect of 5-HT₇ and 5-HT₄ receptors on generation of DA cells observed in the present experiments may be surprising because stimulation of 5-HT₇ and 5-HT₄ receptors increases intracellular levels of cAMP, and it has been observed that TH gene expression and the DA phenotype were enhanced by increasing cellu-

lar levels of cAMP (Riaz et al., 2002; Pliego-Rivero et al., 1999). However, the results of our double immunolabeling studies suggest that there is no significant expression of these receptors in TH-ir cells, and that they are located in glial cells and serotonergic cells (i.e., cells immunoreactive for GFAP and TPH, respectively). A few TH-ir cells also immunoreactive for 5-HT₄ may be immature DA cells transiently expressing 5-HT₄ receptors or non-DA cells transiently expressing TH. Type 6 and 7 5-HT receptors had previously been observed in astrocytes (Hirst et al., 1997, 1998). In addition, Ara-C prevented the 5-HT₇ or 5-HT₄ antagonist-induced increase in generation of TH-ir neurons. This suggests a relevant role for glial 5-HT₇ and 5-HT₄ receptors in the negative effect of 5-HT on generation of DA cells in proliferating neurospheres, although additional glial-derived factors may also be involved in the effects of Ara-C. It has previously been suggested that some of the effects of 5-HT on neurogenesis may be mediated by glia (Liu and Lauder, 1992a,b; Rumajogee et al., 2005), and that glial 5-HT_{1A} receptors elicit the release of S100 β via activation of AC, which promotes the growth of 5-HT neurons (Whitaker-Azmitia, 1991). We observed a simultaneous positive effect on the number of 5-HT cells (i.e., there was a significant decrease in the number of 5-HT cells after treatment with the 5-HT₇ antagonist), which suggests that glial-derived factors induced by 5-HT₇ and 5-HT₄ receptor stimulation may potentiate the induction and/or survival of 5-HT neurons from precursors at the expense of DA neurons. In addition, we observed immunolabeling for 5-HT₇ and 5-HT₄ receptors in cells also labeled for TPH, which suggests that the serotonergic phenotype may also be enhanced via activation of cAMP in 5-HT cells (Galter and Unsicker, 2000; Rumajogee et al., 2004). Several previous studies have detected 5-HT₇ receptors in the raphe nuclei (To et al., 1995; Ruat et al., 1993; Duncan et al., 1999) and it has been suggested that 5-HT receptors may act as autoreceptors on 5-HT neurons (Roberts et al., 2001). Interestingly, 5-HT₇ gene expression has been observed in immortalized serotonergic precursors, and this expression was lost after cell differentiation (Jackson et al., 1997). However, the present experiments using the toxin 5,7-DHT + 5-HT₄ or 5-HT₇ agonists, and those using Ara-C + 5-HT₄ or 5-HT₇ antagonists show that the glial receptors play a major role, and additional studies are necessary to clarify the role of the 5-HT₇ and 5-HT₄ receptors observed in serotonergic cells in the present study.

Most cellular transduction systems that have been described for 5-HT appear to depend on initiation of the signal by a cell surface receptor. However, the

results of several studies have shown that some developmental actions are undertaken through internalization of 5-HT by 5-HT transporters (Fanburg and Lee, 1997; Rumajogee et al., 2004), which are expressed early in neuronal precursors (Yamamoto et al., 1981; Stringer et al., 1994). If the 5-HT-induced decrease in generation of DA neurons is brought about via internalization of 5-HT by transporters, the blockage of 5-HT transport should induce the same effect as a decrease in 5-HT levels (i.e. an increase in generation of DA neurons). In the present study, however, we observed that the selective 5-HT reuptake inhibitor Fluoxetine decreased the number of DA neurons generated in the neurospheres, suggesting that the negative effects induced by 5-HT on generation of DA neurons were not brought about via 5-HT transporters but via cell surface receptors. In fact, the Fluoxetine-induced decrease in generation of DA neurons may be explained by an increased stimulation of 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors, because inhibition of the 5-HT reuptake mechanism should result in an increased concentration of 5-HT.

It has been observed that when the 5-HT transporter is compromised, DA neurons can take up 5-HT using the DAT (Zhou et al., 2002). Therefore, we prevented any internalization of 5-HT by carrying out simultaneous treatment with the 5-HT uptake blocker Fluoxetine and the DA uptake blocker GBR-12935. Again, we observed a decrease in the number of DA neurons. Interestingly, treatment with the DA uptake blocker alone also decreased generation of DA cells (see Du and Iacovitti, 1995; Riaz et al., 2004).

In conclusion, the present results show that inhibition of glial 5-HT₇ and 5-HT₄ receptors increased generation of DA neurons in proliferating neurospheres of mesencephalic precursors. This appears to be responsible for the increase in generation of DA neurons observed after elimination of the 5-HT neurons or reduction of 5-HT levels.

The authors thank Pilar Aldrey for her excellent technical assistance.

REFERENCES

- Azmitia EC. 2001. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull* 56:413–424.
- Beique JC, Chapin-Penick EM, Mladenovic L, Andrade R. 2004. Serotonergic facilitation of synaptic activity in the developing rat prefrontal cortex. *J Physiol* 556:739–754.
- Bonaventure P, Guo H, Tian B, Liu X, Bittner A, Roland S, Salunga R, et al. 2002. Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Res* 943:38–47.

- Branchereau P, Chapron J, Meyrand P. 2002. Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord. *J Neurosci* 22:2598–2606.
- Buznikov GA, Lambert HW, Lauder JM. 2001. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res* 305:177–186.
- Du X, Iacovitti L. 1995. Synergy between growth factors and transmitters required for catecholamine differentiation in brain neurons. *J Neurosci* 15:5420–5427.
- Duncan MJ, Short J, Wheeler DL. 1999. Comparison of the effects of aging on 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors in discrete regions of the circadian timing systems in hamsters. *Brain Res* 829:39–45.
- Fanburg BL, Lee SL. 1997. A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *Am J Physiol* 272:L795–806.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, et al. 2001. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344:710–719.
- Galter D, Unsicker K. 2000. Brain-derived neurotrophic factor and trkB are essential for cAMP-mediated induction of serotonergic neuronal phenotype. *J Neurosci Res* 61:295–301.
- Galzin AM, Poirier MF, Lista A, Chodkiewicz JP, Blier P, Ramdine R, Loo H, et al. 1992. Characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor modulating the release of 5-[3H]hydroxytryptamine in slices of the human neocortex. *J Neurochem* 59:1293–1301.
- Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. 2003. The developmental role of the serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Rev Neurosci* 4:1–11.
- Glennon RA. 2003. Higher-end serotonin receptors: 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇. *J Med Chem* 14:2795–2812.
- Hedlund PB, Sutcliffe JG. 2004. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research. *Trends Pharmacol Sci* 25:481–486.
- Héry F, Boulenguez P, Sémont A, Héry M, Pesce G, Becquet D, Faudon M, et al. 1999. Identification and role of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in primary cultures of rat embryonic rostral raphe nucleus neurons. *J Neurochem* 72:1791–1801.
- Hirst WD, Cheung NY, Rattray M, Price GW, Wilkin GP. 1998. Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT₁ receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res Mol Brain Res* 6:90–99.
- Hirst WD, Price GW, Rattray M, Wilkin GP. 1997. Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br J Pharmacol* 120:509–515.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, et al. 1993. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157–203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533–554.
- Hynes M, Porter JA, Chiang C, Chang D, Tessier-Lavigne M, Beachy PA, Rosenthal A. 1995. Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic Hedgehog. *Neuron* 80:95–101.
- Jackson ZE, Stringer BM, Foster GA. 1997. Identification of 5-HT receptor sub-types in a homogeneous population of presumptive serotonergic neurones. *Neuropharmacology* 36:543–548.
- Krobert KA, Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Levy FO. 2001. The cloned human 5-HT₇ receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363:620–632.
- Lauder JM, Towle AC, Patrick K, Henderson P, Krebs H. 1985. Decreased serotonin content of embryonic raphe neurons following maternal administration of p-chlorophenylalanine: A quantitative immunocytochemical study. *Dev Brain Res* 20:107–114.
- Lindvall O, Bjorklund A. 2004. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 1:382–393.
- Liu J, Lauder JM. 1992a. Serotonin promotes region-specific glial influences on cultured serotonin and dopamine neurons. *Glia* 5:306–317.
- Liu JP, Lauder JM. 1992b. S-100 beta and insulin-like growth factor-II differentially regulate growth of developing serotonin and dopamine neurons in vitro. *J Neurosci Res* 33:248–256.
- Lopez A, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2001. Mechanisms of the effects of exogenous levodopa on the dopamine-denervated striatum. *Neuroscience* 103:639–651.
- Loric S, Maroteaux L, Kellermann O, Launay JM. 1995. Functional serotonin-2B receptors are expressed by a teratocarcinoma-derived cell line during serotonergic differentiation. *Mol Pharmacol* 47:458–466.
- Michel PP, Ruberg M, Agid Y. 1997. Rescue of mesencephalic dopamine neurons by anticancer drug cytosine arabinoside. *J Neurochem* 69:1499–1507.
- Mouillet-Richard S, Mutel V, Loric S, Tournais C, Launay JM, Kekkermann O. 2000. Regulation by neurotransmitter receptors of serotonergic or catecholaminergic neuronal cell differentiation. *J Biol Chem* 275:9186–9192.
- Muñoz A, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2003. Host brain regulation of dopaminergic grafts function: the role of the serotonergic and noradrenergic systems in amphetamine-induced responses. *Synapse* 47:66–76.
- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, et al. 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* 305:187–202.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, et al. 2003. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54:403–414.
- Owens DF, Kriegstein AR. 2002. Developmental neurotransmitters? *Neuron* 36:989–995.
- Pliego Rivero FB, McCormack WJ, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF. 1999. Forskolin-induced expression of

- tyrosine hydroxylase in human foetal brain cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 114:201–206.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, et al. 2001. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 92:179–212.
- Riaz SS, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF. 2002. The controlled conversion of human neural progenitor cells derived from foetal ventral mesencephalon into dopaminergic neurons in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 136:27–34.
- Riaz SS, Spyridon T, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF. 2004. The differentiation potential of human fetal neuronal progenitor cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 153:39–51.
- Roberts C, Price GW, Middlemiss DN. 2001. Ligands for the investigation of 5-HT autoreceptor function. *Brain Res Bull* 56:463–469.
- Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2003. Elimination of serotonergic cells induces a marked increase in generation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors. *Eur J Neurosci* 18:2166–2174.
- Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2005. Expanded mesencephalic precursors treated with antibodies against FGF4 to increase dopaminergic differentiation survive and induce recovery after transplantation in a parkinsonian rat model. *Synapse* 58:13–22.
- Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2004. Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci* 20:1489–1498.
- Rodriguez-Pallares J, Rey P, Soto-Otero R, Labandeira-Garcia JL. 2001. N-Acetyl-cysteine enhances production of dopaminergic neurons from mesencephalic-derived precursor cells. *NeuroReport* 12:3935–3938.
- Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC. 1993. Molecular cloning, characterization, and localization of high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8547–8551.
- Rumajogee P, Verge D, Darmon M, Brisorgueil MJ, Hamon M, Miquel MC. 2005. Rapid up-regulation of the neuronal serotonergic phenotype by brain-derived neurotrophic factor and cyclic adenosine monophosphate: relations with raphe astrocytes. *J Neurosci Res* 81:481–487.
- Rumajogee P, Verge D, Hanoun N, Brisorgueil M-J, Hen R, Lesch K-P, Hamon M, et al. 2004. Adaption of serotonergic neuronal phenotype in the absence of 5-HT autoreceptors or the 5-HT transporter: involvement of BDNF and cAMP. *Eur J Neurosci* 19:937–944.
- Sprouse JS, Aghajanian GK. 1987. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* 1:3–9.
- Stringer BM, Verhofstad AA, Foster GA. 1994. Raphe neural cells immortalized with a temperature-sensitive oncogene: differentiation under basal conditions down an APUD cell lineage. *Brain Res Dev Brain Res* 79:267–274.
- To ZP, Bonnaus DW, Eglen RM, Jakeman RB. 1995. Characterization and distribution of putative 5-HT receptors in guinea-pig brain. *Br J Pharmacol* 115:107–116.
- Waeber C, Sebben M, Bockaert J, Dumuis A. 1996. Regional distribution and ontogeny of 5-HT₄ binding sites in rat brain. *Behav Brain Res* 73:259–262.
- Walther DJ, Bader M. 1999. Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Mol Brain Res* 68:55–63.
- Wang MZ, Jin P, Bumcrot DA, Marigo V, McMahon AP, Wang EA, Woolf T, et al. 1995. Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by Sonic hedgehog protein. *Nat Med* 1:1184–1188.
- Whitaker-Azmitia PM. 1991. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:553–561.
- Whitaker-Azmitia PM. 2001. Serotonin and brain development: Role in the human developmental diseases. *Brain Res Bull* 56:479–485.
- Winkler C, Kirik D, Bjorklund A. 2005. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends Neurosci* 28:86–92.
- Yamamoto M, Steinbusch HW, Jessell TM. 1981. Differentiated properties of identified serotonin neurons in dissociated cultures of embryonic rat brain stem. *J Cell Biol* 91:142–152.
- Zhou FC, Lesch KP, Murphy DL. 2002. Serotonin uptake into dopamine neurons via dopamine transporters: a compensatory alternative. *Brain Res* 942:109–119.
- Zhou FC, Saru Y, Zhang JK. 2000. Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain. *Dev Brain Res* 119:33–45.
- Zhou J, Iacovitti L. 2000. Mechanisms governing the differentiation of a serotonergic phenotype in culture. *Brain Res* 877:37–46.

4.2- Efecto del GABA y la inhibición de receptores de GABA en la diferenciación *in vitro* de precursores mesencefálicos a neuronas dopaminérgicas.

Parga JA, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2007) Effects of GABA and GABA receptor inhibition on differentiation of mesencephalic precursors into dopaminergic neurons in vitro. *Dev Neurobiol* 67:1549-1559.

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitor del SN, pero se sabe que también desempeña una importante función en el desarrollo de otras poblaciones neuronales. Pueden localizarse células sintetizadoras de GABA en cultivos de neuroesferas procedentes del mesencéfalo en desarrollo, pero el papel que tiene en la diferenciación de células DAérgicas no había sido estudiado hasta el momento. En este trabajo hemos estudiado el efecto que tiene el GABA y antagonistas de receptores de GABA en la diferenciación de neuronas DA a partir de precursores mesencefálicos, así como las poblaciones neurales implicadas en el proceso.

El GABA podría actuar a través de receptores de tipo GABA_A y GABA_B, ya que ambas clases de receptores fueron localizados mediante inmunohistoquímica en nuestros cultivos. Estos receptores se encontraron tanto en células dopaminérgicas como en células que no expresan TH.

Cuando bloqueamos la señalización mediada por el receptor GABA_A mediante la bicuculina, antagonista de este receptor, observamos un incremento en el número de células dopaminérgicas. Sin embargo el uso de antagonistas de receptores GABA_B produjo un menor número de células TH que los cultivos no tratados, al igual que el antagonista de receptores de glicina, estricnina, usado para probar la especificidad de la bicuculina. No se observaron diferencias en el número de células DAérgicas entre los cultivos tratados con GABA y los controles, ni cuando se emplearon ambos antagonistas al mismo tiempo.

Las diferencias en el número de células DAérgicas obtenidas con estos tratamientos no pudieron ser atribuidas a un aumento en la proliferación de las células en cultivo ni a una menor supervivencia, ya que el tratamiento con los antagonistas no modificó el número de células TH que incorporaban BrdU (marcador de proliferación y síntesis de ADN) ni provocó diferencias en el marcaje con Hoechst 33342 o TUNEL (indicadores de apoptosis)

Neurosferas tratadas con antagonistas para receptores GABA_A o GABA_B no mostraron diferencias en el número de células 5-HT respecto a los controles. El tratamiento con el inhibidor de la replicación AraC no evitó el efecto que los antagonistas de receptores de GABA tienen sobre el número de células TH-ir.

Effects of GABA and GABA Receptor Inhibition on Differentiation of Mesencephalic Precursors into Dopaminergic Neurons In Vitro

J.A. Parga, J. Rodriguez-Pallares, M.J. Guerra, J.L. Labandeira-Garcia

Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology, Department of Morphological Sciences, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 18 January 2007; revised 13 April 2007; accepted 17 April 2007

ABSTRACT: Neurotransmitters have been shown to control CNS neurogenesis, and GABA-mediated signaling is thought to be involved in the regulation of nearly all key developmental stages. Generation of dopaminergic (DA) neurons from stem/precursor cells for cell therapy in Parkinson's disease has become a major focus of research. However, the possible effects of GABA on generation of DA neurons from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors have not been studied. In the present study, GABA_A and GABA_B receptors were found to be located in DA cells. Treatment of cultures with GABA did not cause significant changes in generation of DA cells from precursors. However, treatment with the GABA_A receptor antagonist bicuculline (10^{-5} M) led to a significant increase in the number DA cells, and treatment with the GABA_B receptor antagonist CGP 55845 (10^{-5} M) to a significant decrease. Simultaneous treatment with

bicuculline and CGP 55845 did not induce significant changes. Apoptotic cell death studies and bromodeoxyuridine immunohistochemistry indicated that the aforementioned differences in generation of DA neurons are not due to changes in survival or proliferation of DA cells, but rather to increased or decreased differentiation of mesencephalic precursors towards the DA phenotype. The results suggest that these effects are exerted via GABA receptors located on DA precursors, and are not an indirect consequence of effects on the serotonergic or glial cell population. Administration of GABA_A receptor antagonists in the differentiation medium may help to obtain higher rates of DA neurons for potential use in cell therapy for Parkinson's disease. © 2007 Wiley Periodicals, Inc. *Develop Neurobiol* 67: 1549–1559, 2007

Keywords: GABA; dopamine; progenitor cells; cell therapy; Parkinson's disease

INTRODUCTION

The search for alternative sources of dopaminergic (DA) neurons for grafting other than primary fetal tissue has become a major topic in Parkinson's disease (PD) research. Previous studies have shown

that precursor cells can be proliferated in culture under serum free conditions as floating neurospheres in response to mitogens such as epidermal growth factor (EGF). After differentiation in vitro, the precursors contained in these neurosphere cultures are capable of generating neurons with phenotypes similar to those normally derived from the corresponding region in vivo (Parmar et al., 2002; Riaz and Bradford, 2005). Precursor cells can be isolated from the embryonic mesencephalic flexure, where DA neurons are formed during normal development. They spontaneously convert to neurons and glia following mitogen withdrawal, but the number of neurons expressing the DA phenotype is low. However, dif-

Correspondence to: J.L. Labandeira-Garcia (cmlaband@usc.es).

Contract grant sponsors: Galician Government (XUGA) and Spanish Ministry of Education (MEC).

© 2007 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 24 May 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/dneu.20531

ferentiation of precursor cells to DA neurons can be increased by different methodological approaches (Wang et al., 1995; Rodriguez-Pallares et al., 2001; Riaz et al., 2002; Rodriguez-Pallares et al., 2004). Clarification of the signals involved in DA neuron induction is highly relevant in understanding brain development and also in obtaining DA neurons for possible cell therapy in PD (Lindvall and Björklund, 2004; Winkler et al., 2005).

There is increasing evidence that neurotransmitter signaling is involved in early developmental events, some of which occur prior to synapse formation (Lauder, 1993; Nguyen et al., 2001; Owens and Kriegstein, 2002a,b). Functional neurotransmitter receptors are expressed by a wide variety of neuronal progenitors during embryonic development, and several studies have shown that neurotransmitters participate in the extrinsic control of CNS neurogenesis involving progenitor cell proliferation, migration, differentiation, and cell death (Haydar et al., 2000; Nguyen et al., 2001). Several recent studies have shown that neurotransmitters regulate generation of DA neurons from proliferating cell aggregates (Du and Iacovitti, 1995). Administration of DA or DA agonists induces an increase in generation of DA neurons *in vitro* (Guo et al., 2002; Riaz et al., 2002, 2004; Li et al., 2006). On the contrary, we have recently shown that serotonin (5-HT) induces a decrease in generation of DA neurons from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors via 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors (Rodriguez-Pallares et al., 2003; Parga et al., 2006). During embryonic development, GABA appears long before the onset of inhibitory synaptogenesis, and GABA-mediated signaling is thought to be involved in the regulation of nearly all key developmental stages ranging from cell proliferation, differentiation, and migration to circuit refinement (Varju et al., 2001; Owens and Kriegstein, 2002a,b). Furthermore, GABA receptors are present in neural progenitors from the very beginning of neuronal determination, and both GABA_B and particularly GABA_A receptors have been involved in development regulation (Wang et al., 2003; Jelitali et al., 2004; Schlesinger et al., 2004). However, the possible effects of GABA on generation of DA neurons from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors have not been studied. In the present study, we investigated the possible effects that GABA and GABA receptors may have on the generation of DA phenotype neurons from mesencephalic precursors, and whether the observed effects may be the result of indirect effects on other cell populations such as glial cells or serotonergic neurons.

METHODS

Isolation and Culture of Mesencephalic Precursor Cells

Mesencephalic precursor cells were obtained from Sprague-Dawley rat embryos of 12 days gestation (E12). All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), and approved by the corresponding committee at the University of Santiago de Compostela. Rats were deeply anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg). Ventral mesencephalic tissue was dissected from the embryos and incubated in 0.1% trypsin (Sigma, St Louis, MO), 0.05% DNase (Sigma) and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Paisley, UK) for 20 min at 37°C. The tissue was rinsed in DNase/DMEM and mechanically dissociated. The resulting cell suspension was centrifuged at 50g for 5 min, the supernatant was carefully removed and the pellet resuspended in 0.05% DNase/DMEM to the final volume required. The number of viable cells in the suspension was estimated by acridine orange/ethidium bromide staining, and cells were plated onto 35-mm culture dishes (BD Falcon, Le Pont de Claix, France) at a density of 5×10^5 cells/mL. Cells were maintained in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂; 37°C). The proliferation medium was composed of HAMS F12/DMEM (1:3), B27 supplement (1:50; Gibco), and EGF (20 ng/mL; Sigma). After 7 days *in vitro*, cells formed floating clusters (i.e. cell aggregates) that were mechanically dissociated and seeded onto fresh EGF-containing medium, and maintained for another 7 days to purify the long-term propagating precursor cells and obtain a second generation of cell aggregates. After 2 weeks, neurospheres were gently triturated and plated onto culture dishes previously coated with poly-L-lysine (1 mg/mL; Sigma) in the absence of EGF.

Cells from each batch of neurospheres were divided into control cultures (i.e. untreated), and cultures subjected to different treatments at plating, and processed in the same culture batch, as follows. In control cultures, the neurospheres were seeded into a differentiation culture medium composed of HAMS F12/DMEM (1:1) and 10% fetal bovine serum (FBS; Biochrom KG, Berlin, Germany). A second group of cultures were seeded in the presence of GABA (10^{-4} M; Sigma). A third group of cultures were plated on to the differentiation medium supplemented with GABA_A (Bicuculline; (–)-Bicuculline methiodide, 10^{-6} to 10^{-5} M; Sigma) or GABA_B (CGP 55845; (2S)-3-[[[(15)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinic acid, 10^{-7} to 10^{-5} M; Tocris Cookson, Bristol, UK) receptor antagonists to investigate the effects of the corresponding receptors on the differentiation of progenitors. Stock solutions of the antagonists (2×10^{-4} M) were prepared in DMEM, filter sterilized, divided into aliquots and frozen. Aliquots were thawed immediately before use. The range of concentrations of specific antagonists or GABA was chosen on the basis of the results of previous studies. When used in combination the doses of the drug

were determined based on the maximal response obtained from among the concentrations tested. A fourth group of cultures were seeded in the presence of GABA receptor antagonists and Bromodeoxyuridine (BrdU; 1 μ M, 7 days, Sigma) to obtain an index of DA cell replication (see later). Other cultures were seeded in the presence of GABA receptor antagonists and a cell cycle inhibitor, the antimetabolic agent Cytosine- β -D-arabinofuranoside (Ara-C, 1 μ M; 7 days; Sigma) during the differentiation period or the same doses of Ara-C alone, to inhibit replication of non-neuronal cells and to study if the effects of these antagonists are mediated by glial cells. We have previously observed that after treatment with Ara-C the number of astrocytes (GFAP-ir cells, see later) is 10–15% of that observed in control cultures (Parga et al., 2006; see also Michel et al., 1997). Treatments were added to the culture medium for an incubation period of 7 days and cells were maintained in cultures during 7 days *in vitro*. However, some cultures treated with the GABA_B receptor antagonist CGP 55845 and the corresponding controls were incubated for only 2 days to study apoptosis at early stages of development of the cell aggregates (see later). Finally, the specificity of the effect of CGP 55845 on GABA_B receptor inhibition was verified with a second GABA_B receptor antagonist (CGP 54626; [S-(R*,R*)]-[3-[[1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino]-2-hydroxypropyl](cyclohexylmethyl) phosphinic acid, 10⁻⁶ to 10⁻⁵ M; Tocris Cookson), and the possible effect of inhibiting glycine mediated responses by bicuculline treatment was studied in cultures treated with the glycine receptor antagonist Strychnine (Strychnine hydrochloride, 5 \times 10⁻⁷ M; Sigma). It has previously been shown that 0.5 μ M Strychnine abolishes the glycinergic responses without affecting GABA_A receptor-mediated responses (O'Brien and Berger, 1999).

Immunolabeling

Cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; pH 7.4) for 20 min, and washed three times in DPBS. Cultures were preincubated with a blocking solution containing 10% normal serum in DPBS with 1% bovine serum albumin (DPBS-BSA) and 0.3% Triton X-100 (Sigma) for 1 h. The cultures were then incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal anti-tyrosine hydroxylase antibody (TH, Sigma; 1:30,000) as a marker of DA neuron phenotype, or a rabbit polyclonal antiserum against serotonin (5-HT; Incstar; 1:7500) or a mouse monoclonal anti-tryptophan hydroxylase antibody (TPH, Sigma; 1:1000) as markers of 5-HT cells, or a rabbit polyclonal antibody against GABA (Sigma; 1:5000) as a marker of GABAergic cells, or a rabbit polyclonal antibody against α 3 subunit (GABA_A α 3, Sigma; 1:2000) as marker of GABA_A receptors, or a guinea pig polyclonal antibody against GABA_B receptor 1 subunit (GABA_BR1, Chemicon; 1:20,000) as a marker of GABA_B receptors. We have previously observed that rat cholinergic, DA, noradrenergic and serotonergic neurons express GABA_A receptors derived from the α 3 subunit (Rodríguez-Pallares et al., 2001).

Cultures were washed and incubated for 1 h with the corresponding biotinylated secondary antibody diluted 1:500. The cultures were washed then incubated for 90 min with avidin–biotin–peroxidase complex (ABC, Vector, 1:150). Finally, the labeling was revealed with 0.04% hydrogen peroxide and 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma).

Representative cultures were also processed for double immunofluorescence against TH and GABA_A or GABA_B receptor markers to identify the expression of these receptors in DA neurons. Cultures were incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibodies (see earlier), at double antibody concentration containing 1% normal serum and 0.3% Triton X-100 diluted in DPBS-BSA. The cultures were rinsed with DPBS, then incubated for 180 min with the corresponding secondary antibodies conjugated with cyanine 3.18 (Cy3; Chemicon; 1:250). For the second labeling, cultures were incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibodies. Cultures were then washed and incubated with secondary antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; Chemicon; 1:100). To visualize the fluorescent labeling, we used a laser confocal microscope (TCS-SP2, Leica, Heidelberg, Germany) and a sequential scanning method to avoid any possible overlap. In all experiments the control cultures, in which primary antibody was omitted, were immunonegative for these markers.

Apoptotic Cell Death Measurement

Apoptotic cell death of TH-ir cells was determined by DNA staining and the TUNEL assay in control cultures and cultures treated with GABA receptor antagonists for 7 days or 2 days. Cultures were processed for immunofluorescence of TH (see earlier), and then all cell nuclei were stained with *bis*-benzimidazole (Hoechst 33342; Sigma) added to a final concentration of 3 \times 10⁻⁶ M (Hilwig and Gropp, 1975; Pardo et al., 1997). Apoptotic cells were identified by chromatin condensation.

The TUNEL assay involves measurement of the fragmented DNA of the cells by use of the enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase to incorporate fluorescein-12-dUTP at the 3'-OH ends of the DNA (Gavrieli et al., 1992). Cultures were processed for immunofluorescence of TH (see earlier) and the TUNEL assay was then performed with a DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and following the manufacturer's instructions. In cultures treated for 2 days with the GABA_B receptor antagonist CGP 55845, the total number of apoptotic cells was also counted to estimate any possible decrease in the number of TH-ir neurons due to enhanced death of precursors. The labeling was visualized by epi-fluorescence microscopy.

Bromodeoxyuridine Labeling

BrdU staining was used to obtain an index of DA cell replication. For this, cells from control groups and groups treated with GABA_A or GABA_B antagonists

were incubated in the corresponding differentiation medium with 1 μ M BrdU for 7 days (i.e. during the differentiation period; Arsenijevic and Weiss, 1998). The cells were then fixed, incubated with 2 M HCl for 30 min at 37°C, and washed in borate buffer (pH 8.9) to neutralize the acid. Cells were processed for double immunofluorescence against TH (see earlier) and BrdU (Sigma; 1:20). The immunolabeling was visualized by epi-fluorescence microscopy

Quantification and Data Analysis

The same investigator, who was unaware of the treatment history, always counted the cells using phase contrast or epi-fluorescence microscopy (Nikon's Eclipse inverted microscope, Tokyo, Japan) at X100 magnification. In each experiment, 15 culture dishes, and 15 randomly chosen cell aggregates per dish were counted. A few culture dishes that did not contain at least 15 aggregates were excluded from counting. In each cell aggregate, the number of DA or 5-HT cells was estimated by focusing down through the aggregate and counting all immunoreactive cells that came into focus, or all cells double labeled for TH and BrdU or TH and apoptosis markers. The thickness of the aggregates was $44.3 \pm 3.4 \mu\text{m}$ ($n = 50$), as estimated with an Olympus CAST-Grid System. Thus, 1389 ± 161 TH-ir cells were counted by experiment in a control group. All experiments were replicated at least three times using new groups of EGF-responsive mesencephalic precursor cells. The results were normalized to the counts of the control group of the same batch (i.e. expressed as a percentage of the control group counts) to counteract any possible variation from one batch to another. Statistical differences between groups (mean \pm SEM) were tested by one-way ANOVA followed by post hoc Tukey test ($p < 0.05$). Normality of populations and homogeneity of variances were tested before each ANOVA. Statistical analysis was performed by SigmaStat 3.0 from Jandel Scientific (San Rafael, CA).

RESULTS

Location of GABA-ir Cells and GABA Receptors Within the Cell Aggregates

After 7 days, cells differentiated from the proliferating neurospheres showed different morphologies. Most cells appeared as differentiated neurons or glia. However, numerous cells with undifferentiated morphology (i.e. rounded cell bodies without processes) were still present in the aggregates. Most of the TH-ir cells were mature neurons with long and branching processes, and only few appeared to be immature [Fig. 1A–C]. A considerable number of serotonin immunoreactive cells were also observed in the aggregates (see Rodriguez-Pallares et al., 2003 for details). Numerous GABA

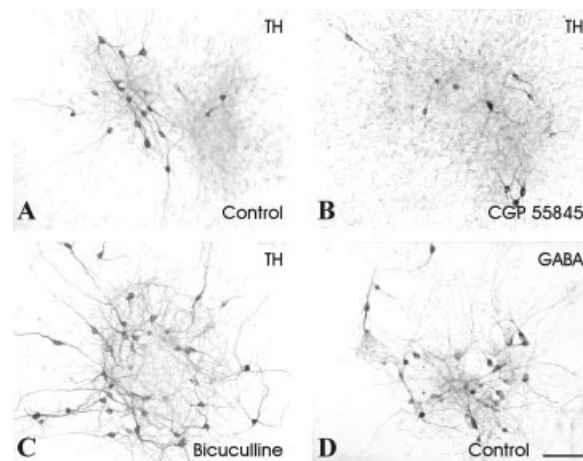


Figure 1 Microphotographs of dopaminergic (i.e. TH-ir; A–C) and GABAergic (D, control culture) cells differentiated from aggregates of mesencephalic precursor cells. Cultures of precursor cells treated with the GABA_B receptor antagonist CGP 55845 (B) contained less TH-ir cells than the non-treated control cell cultures (A). However, cultures treated with the GABA_A receptor antagonist bicuculline contained significantly more TH-ir cells than control cultures (C). Scale bar = 100 μm .

immunoreactive cells were also observed [Fig. 1(D)], as well as GABA_A or GABA_B receptor immunolabeled cells [Fig. 2(A,D)]

Double immunolabeling for TH and GABA_A or GABA_B receptors revealed that DA neurons bore both GABA_A and GABA_B receptors. However, GABA_A and GABA_B receptors were also located in TH-negative cells [Fig. 2(A–F)].

Effect of GABA and GABA Antagonists on Generation of TH-ir Cells from Neurospheres of Mesencephalic Precursor Cells

There was no significant difference between the number of TH-ir cells in cultures treated with GABA and in control cultures [Fig. 3(C)]. Treatment with the GABA_A receptor antagonist led to a significantly greater number of TH-ir cells than observed in non-treated controls. However, treatment with the GABA_B receptor antagonist CGP 55845 led to significantly lower numbers of TH-ir cells than observed in nontreated controls. The effect was maximal at doses of 10^{-5} M for both bicuculline and CGP 55845 [Figs. 3(A,B), and 1(B,C)]. Finally, the number of TH-ir neurons in cultures treated simultaneously with bicuculline and CGP 55845 at doses of 10^{-5} M was not significantly higher than in control cultures [Fig. 3(C)]. The specificity of the effect of

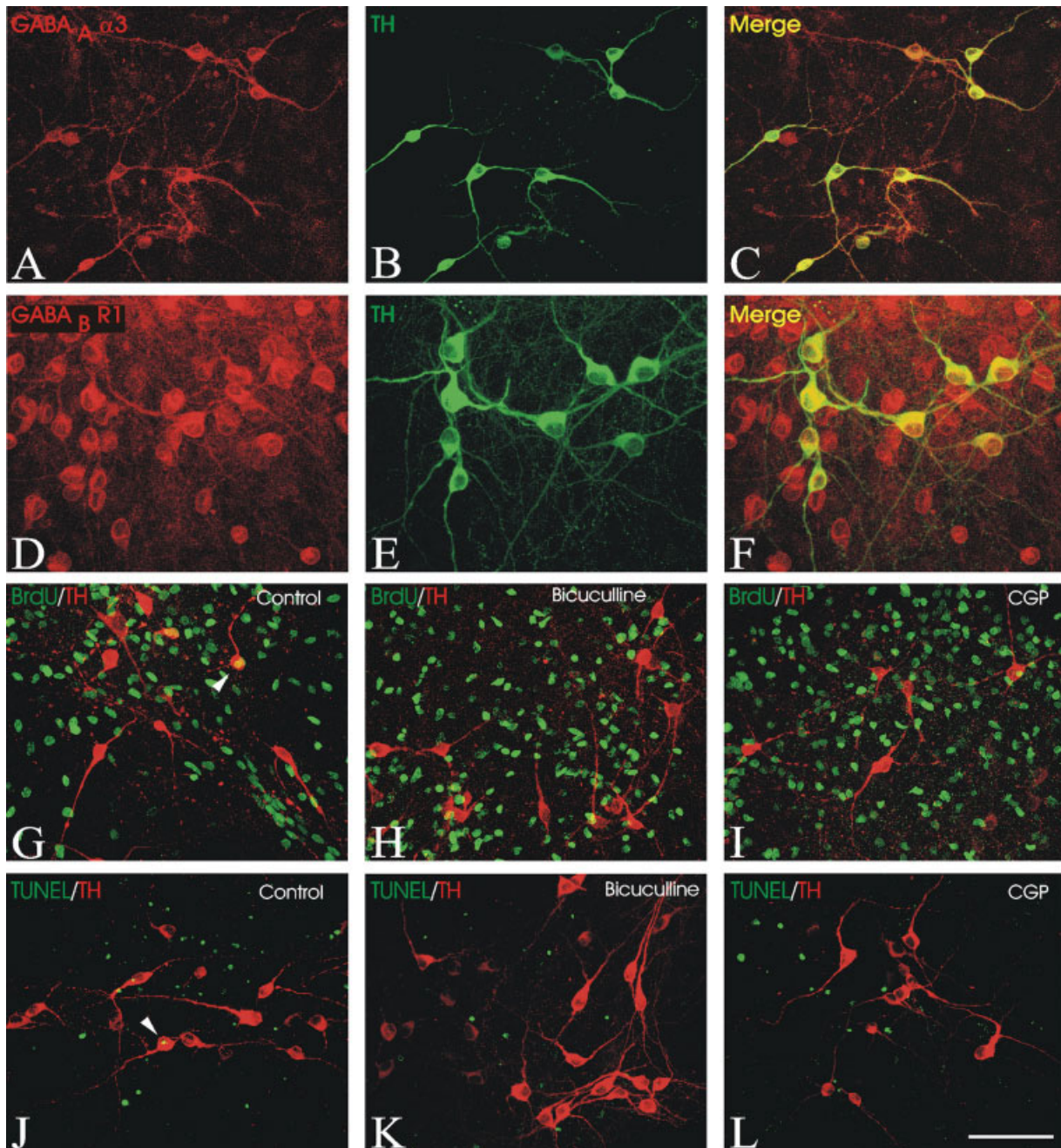
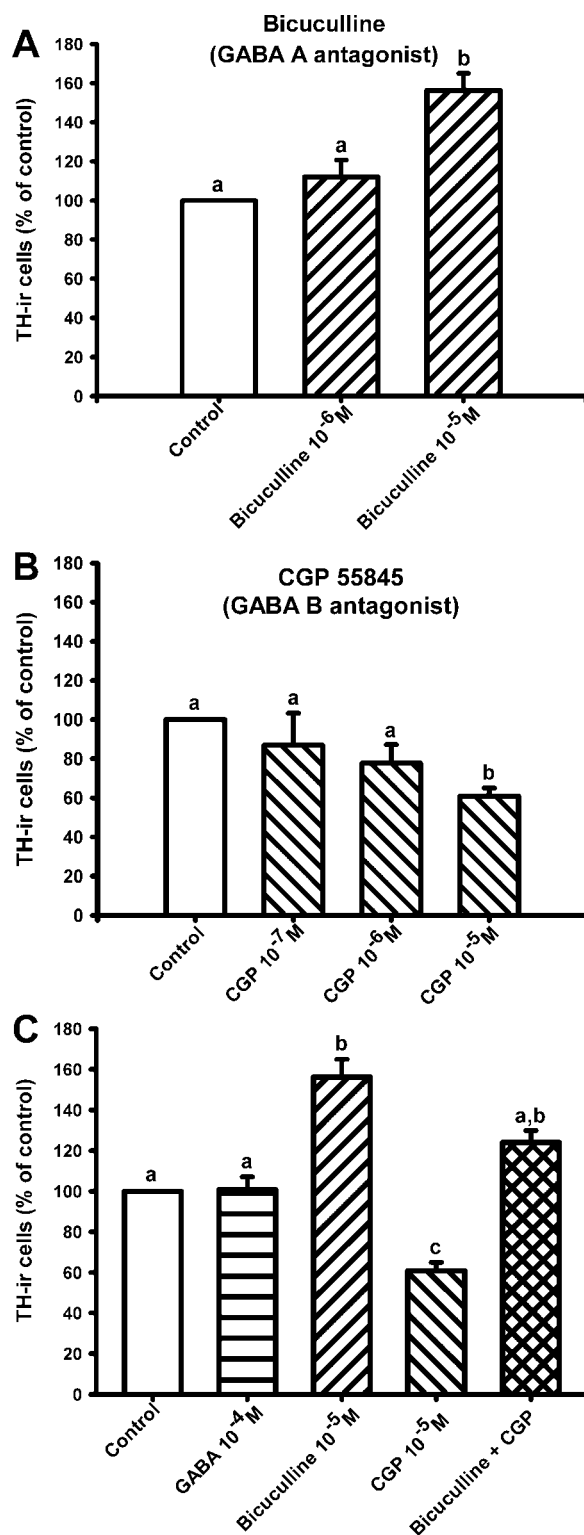


Figure 2 Double fluorescent labeling for GABA_A (A) or GABA_B (D) receptors and the dopaminergic marker tyrosine hydroxylase (TH; B, E) observed by confocal laser scanning microscopy in control neurospheres differentiated from mesencephalic precursors. Cells labeled for TH were also immunoreactive for GABA_A (C) and GABA_B (F) receptors. Cultures treated for 7 days with GABA_A (H, K) or GABA_B (I, L) receptor antagonists and subjected to double immunofluorescence for TH (red) and BrdU (green; H, I) or TUNEL (green; K, L) were not significantly different from control cultures (G, H). Scale bar: 100 μ m in A-C and G-L; 50 μ m in D-F.

CGP 55845 on GABA_B receptor inhibition was confirmed with the second GABA_B receptor antagonist (CGP 54626), which also induced a significant decrease in the number of TH-ir neurons at doses of

10^{-5} M ($45.1\% \pm 4.4\%$ of the control values) or 10^{-6} M ($48.7\% \pm 8.2\%$ of the control values). The possible effect of inhibiting glycine mediated responses by bicuculline treatment was studied in cul-

tures treated with 0.5 μ M strychnine. However, treatment with strychnine did not induce an increase (i.e. as observed after bicuculline treatment), but rather a decrease in the number of TH-ir cells ($63.2\% \pm 5.5\%$ of controls).



BrdU Labeling and Apoptotic Cell Death

In cultures incubated with BrdU, a large number of cells incorporated the BrdU. However, double TH and BrdU labeling revealed that only a few TH-ir cells incorporated BrdU in the control groups. In groups treated with the GABA_A receptor antagonist bicuculline during the differentiation period, the number of TH-ir cells was significantly higher than in control cultures (see earlier); however, the number of cells showing double labeling for TH and BrdU was not significantly higher than in control cultures. In groups treated with the GABA_B receptor antagonist CGP 55845 during the differentiation period, the number of TH-ir cells was significantly lower than in control cultures (see earlier); however, we did not observe any significant difference in the number of cells showing double labeling for TH and BrdU [Figs. 4(A) and 2(G–I)]. This indicates that the changes induced by GABA_A and GABA_B receptor antagonists in number of TH-ir cells generated from neurosphere cultures were not because of changes in the proliferation of the DA precursors during the differentiation period.

Cultures treated with GABA_A or GABA_B receptor antagonists for 7 days and subjected to nuclear staining with Hoechst 33342 or to the TUNEL assay did not show significant differences in the number of apoptotic TH-ir cells in comparison with the corresponding control cultures (i.e. nontreated cultures), suggesting that the differences in the number of TH-ir cells induced by treatment with GABA_A or GABA_B receptor antagonists were not due to decreased or increased rates of apoptotic death of these cells [Figs. 4(B,C) and 2(J–L)]. Since treatment with GABA_B receptor antagonists led to significantly lower numbers of TH-ir cells than observed in non treated controls, the possible apoptotic death of TH-ir cells or precursors in cultures treated with CGP 55845 was also examined at early stages of develop-

Figure 3 Effects of treatment with GABA or GABA antagonists on the number of TH-ir cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. The generation of TH-ir cells was increased by treatment with the GABA_A receptor antagonist bicuculline (A) and decreased by the GABA_B receptor antagonist CGP 55845 (B), but was not significantly affected by treatment with GABA or simultaneous treatment with bicuculline and CGP 55845. The data are expressed as percentages of the number of TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that differ significantly are indicated by a different letter ($p < 0.05$, one-way ANOVA and post-hoc Tukey tests).

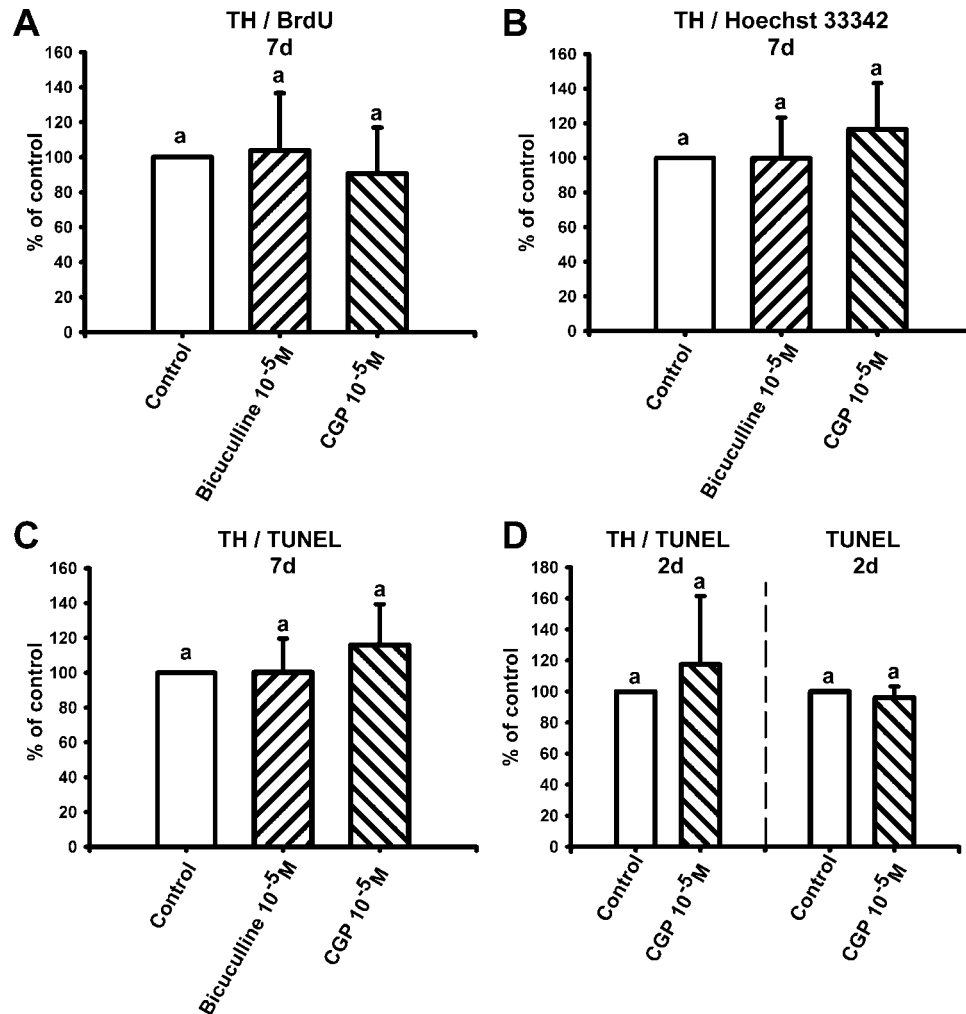


Figure 4 Effects of 7 days (A-C) or 2 days (D) of treatment with the GABA_A receptor antagonist bicuculline or the GABA_B receptor antagonist CGP 55845 on proliferation of TH-ir cell precursors (i.e. cells double labeled for TH and BrdU; A), and on the number of TH-ir apoptotic cells (i.e. cells double labeled for TH and Hoechst or TUNEL; B-D), and on the total number of apoptotic cells (D). No significant differences were observed in comparison with controls. The data are expressed as percentages of the number of positive cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that do not differ significantly are indicated by the same letter ($p < 0.05$, one-way ANOVA).

ment of the cell aggregates (i.e. 2 days). There were no significant differences between control and treated cultures in the number of apoptotic TH-ir cells or in the total number of apoptotic cells [Fig. 4(D)].

Effect of GABA Receptor Antagonists on the Serotonergic Population and Glial Cells

It has previously been observed that a decrease in generation of serotonergic cells leads to a marked increase in the generation of DA cells from neuro-

spheres (Rodriguez-Pallares et al., 2003), and therefore we also studied the effects of treatment with GABA_A and GABA_B receptor antagonists on the generation of 5-HT neurons. However, neurospheres treated with the GABA_A receptor antagonist bicuculline or the GABA_B receptor antagonist CGP 55845 did not show significant differences in the number of 5-HT cells with respect to controls [Fig. 5(A)].

Finally, a group of cultures were treated with the antimetabolic agent Ara-C (1 μ M) during the differentiation period to inhibit replication of non-neuronal cells. Treatment with Ara-C did not prevent the increase or decrease in the number of TH-ir cells

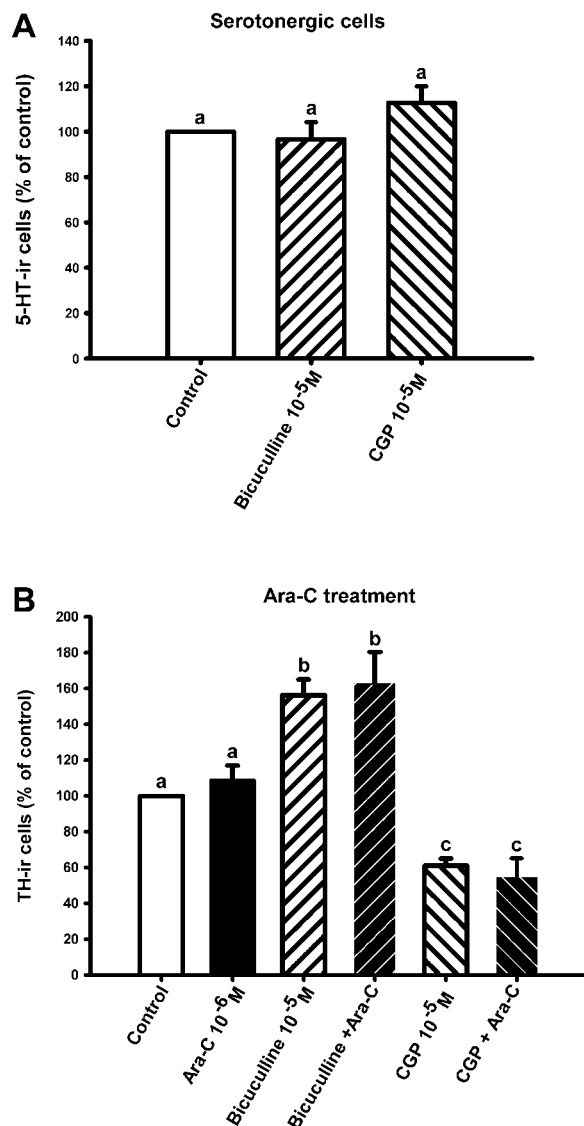


Figure 5 Effects of treatment with the GABA_A receptor antagonist bicuculline or the GABA_B receptor antagonist CGP 55845 and/or the antimetabolic agent Cytosine- β -D-arabinofuranoside (Ara-C) on the number of serotonergic (5-HT-ir; A) or the number of dopaminergic (TH-ir; B) cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. No significant effects were observed. The data are expressed as percentages of the number of TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that differ significantly are indicated by a different letter ($p < 0.05$, one-way ANOVA and post-hoc Tukey tests).

induced by the GABA_A receptor antagonist bicuculline or the GABA_B receptor antagonist CGP 55845, respectively [Fig. 5(B)], which suggests that glial cells do not play a major role in the effects induced by these antagonists on generation of DA cells.

DISCUSSION

In the present study, administration of GABA did not significantly affect the number of TH-ir neurons generated from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors. Similarly, administration of GABA did not induce changes in the number of GABA-, or 5-HT-, or TH-ir neurons in primary cultures of brain stem or hippocampal neurons; these were, however, modified by administration of GABA_A antagonists but not by GABA agonists (Barbin et al., 1993; Liu et al., 1997; Guo et al., 2002). It has been suggested that the failure of GABA itself to induce effects on cultured cells may be attributable to the presence of endogenous GABA (i.e. that released by GABA neurons; Barbin et al., 1993; Becquet et al., 1993; Liu et al., 1997). A large number of GABA-ir cells are usually present in cultures after proliferation and differentiation of neurospheres of mesencephalic precursors or stem cells (Arenas, 2002; Barberi et al., 2003), as also observed in the present study. Therefore, the lack of significant effects of GABA on TH-ir neurons in the present study may also be attributable to the presence of endogenous GABA. This is also supported by the significant effect induced by treatment with GABA_A or GABA_B antagonists on generation of TH-ir neurons. In addition, we observed treatment with GABA_A and GABA_B antagonists to have contrary effects, which may also explain the lack of significant effects induced by treatment with GABA or simultaneous treatment with GABA_A and GABA_B antagonists. It has been suggested that bicuculline treatment may also inhibit glycine mediated responses (O'Brien and Berger, 1999). This may be responsible for the bicuculline-induced increase in generation of DA neurons. However, treatment with the glycine receptor antagonist strychnine did not induce an increase but rather a slight decrease in the number of TH-ir cells. Possible mechanisms involved in the strychnine-induced decrease in the number of DA neurons were not investigated in the present study. However, this effect may be related to glycine receptor-mediated modulation of DA release (Bennet and Gronier, 2005; Molander and Soderpalm, 2005). Treatment with the GABA_A receptor antagonist bicuculline induced a significant increase in the number of TH-ir cells, suggesting that GABA_A receptor stimulation by endogenous GABA decreases generation of DA neurons from neurospheres. Treatment with the GABA_B receptor antagonists CGP 55845 or CGP 54626 induced a significant decrease in the number of TH-ir cells, suggesting that GABA_B receptor stimulation by endogenous GABA increases generation of DA neurons from neurospheres. Simultaneous treat-

ment with GABA_A and GABA_B antagonists did not induce any significant difference in the number of TH-ir cells, suggesting that GABA does not have any significant effect on the generation of DA neurons via mechanisms different to GABA_A or GABA_B receptor stimulation.

The changes induced by treatment with GABA_A or GABA_B antagonists in the number of TH-ir neurons obtained from precursors may be related to an increase in the generation of the DA phenotype from precursor cells, and also to an increase in the survival of cells with the DA phenotype. Several studies have reported that GABA promotes survival (Liu et al., 1997; Luk and Sadikot, 2001) or has no effects (Fiszman et al., 1999; Nguyen et al., 2003) on survival of different types of neuronal progenitors or developing neurons. It appears that GABA may induce different effects depending on the type of cell or experimental conditions. The data obtained in the present study with Hoechst staining and the TUNEL assay suggest that the increase or decrease in the number of TH-ir neurons after treatment with GABA_A or GABA_B receptor antagonists is not due to an increase in the survival of TH-ir neurons.

The increase in the number of TH-ir neurons appears to be related to an increase in the generation of TH-ir neurons. This may be due to either increased proliferation of precursors of DA neurons or to an increase in differentiation of DA neurons from mesencephalic precursor cells. Negative, positive and no significant effects of GABA on different types of neuronal progenitors have been reported (Fiszman et al., 1999; Luk and Sadikot, 2001; Owens and Kriegstein, 2002a,b; Nguyen et al., 2003). It has also been observed that GABA_A receptor activation is mitogenic in the proliferative neocortical ventricular zone and antiproliferative in the subventricular zone (Haydar et al., 2000). The present data from BrdU immunohistochemistry suggest that there is no significant increase in the proliferation of DA precursors during the differentiation period in cultures treated with GABA_A or GABA_B receptor antagonists, and also that the observed differences in the generation of TH-ir neurons are due to an increase in differentiation of DA neurons from mesencephalic precursor cells. Previous studies have shown that GABA can affect different aspects of neuronal differentiation *in vitro* (Owens and Kriegstein, 2002a,b; Jelitai et al., 2004). Although the mechanisms of the differentiation effects exerted by GABA have not been totally clarified, they are usually mediated by activation of GABA receptors, as GABA receptor antagonists have shown to block the effects in the present and other experiments.

In the present and other studies both GABA_A and GABA_B receptors were located in DA cells (Kim et al., 1997; Wirtshafter and Sheppard, 2001; Schlesinger et al., 2004) as well as in glial cells and other cell populations such as serotonergic cells (Wirtshafter and Sheppard, 2001), which have been shown to regulate generation of DA cells from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors. We have previously shown that elimination of serotonergic cells or inhibition of serotonin synthesis induces a marked increase in generation of DA cells from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors (Rodríguez-Pallares et al., 2003), and it has been reported that GABA_A receptor antagonists significantly reduced the survival of serotonergic neurons in primary cultures from rat brainstem (Liu et al., 1997). Therefore, the increase in generation of DA neurons observed in the present study after treatment with the GABA_A receptor antagonist bicuculline may be the consequence of a bicuculline-induced reduction in the number of serotonergic cells. However, we did not observe significant differences in the number of serotonergic cells generated from the neurospheres after treatment with GABA_A or GABA_B antagonist. It is also possible that GABA receptor antagonists or GABA receptor activation induce significant changes in 5-HT release without significant changes in the number of serotonergic neurons. It has been observed that inhibition of GABA_A receptors or activation of GABA_B receptors decreases 5-HT release in primary cultures of raphe cells (Becquet et al., 1993), and this may explain the results observed in the present experiments after treatment of cultures with GABA_A or GABA_B receptor antagonists. However, we have recently observed that 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors located in glial cells play a major role in the decreasing effect of serotonin on generation of DA neurons from neurospheres, which is inhibited by elimination of glial cells with Ara-C (Parga et al., 2006). In the present study, the effects of the GABA antagonists on generation of DA neurons were not significantly modified by treatment with Ara-C, which indicates that they are not caused by changes in levels of serotonin and that glial cells do not play a major role, and also suggests that the effects are exerted by GABA receptors located on the DA precursors.

A number of compounds have been reported to increase generation of TH-ir neurons from precursors; most of these compounds induce increases in the number of TH-ir neurons of between 150 and 400% with respect to control values (Riaz and Bradford, 2005 for review). We have obtained increases of 300–400% with antioxidant treatments (Rodríguez-Pallares et al., 2001, 2002). Treatment with different

cytokines has led to increases of between 150 and 350% (Ling et al., 1998; Rodriguez-Pallares et al., 2004, 2005). Neurotransmitters have also been shown to regulate generation of DA neurons from precursors. Treatment with DA alone induced small or non significant increases in DA neuron generation (Du and Iacovitti, 1995; Riaz et al., 2002, 2004), and serotonin receptor antagonists induced an increase of 250% in the generation of TH-ir neurons (Parga et al., 2006). Interestingly, however, it has been shown that treatment with combinations of compounds that induce moderate increases in generation of DA neurons led to greater increases in the number DA cells (Potter et al., 1999; Riaz and Bradford, 2005; Riaz et al., 2002, 2004). Co-treatment with neurotransmitters or neurotransmitter antagonists and growth factors has been particularly effective (Du and Iacovitti, 1995; Riaz et al., 2002, 2004). In the present study, treatment with the GABA_A receptor antagonist bicuculline induced a 160% increase in generation of TH-ir neurons, which is lower than the increase induced by some of the aforementioned antioxidants or cytokines and higher than that observed after treatment with DA alone or growth factors such as BDNF or GDNF alone (Du and Iacovitti, 1995; Riaz et al., 2002, 2004; Riaz and Bradford, 2005). As previously observed for DA, cotreatment with GABA_A receptor antagonists and growth factors and/or other compounds may induce further increases in generation of DA neurons from precursors or stem cells.

In conclusion, the present results show that GABA_A receptor activation decreases and GABA_B receptor activation increases generation of DA neurons from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors. A large number of GABAergic cells and a considerable level of endogenous GABA are usually found together with DA neurons differentiated from precursor or stem cells, and the present results suggest that administration of GABA_A receptor antagonists in the differentiation medium may help in obtaining greater numbers of DA neurons for potential use in cell therapy for PD.

The authors thank Pilar Aldrey for her excellent technical assistance.

REFERENCES

- Arenas A. 2002. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 57:785–808.
- Arsenijevic Y, Weiss S. 1998. Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: Distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 18:2118–2128.
- Barberi T, Klivenyi P, Calingasan N, Hyojin L, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, et al. 2003. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 21:1200–1207.
- Barbin G, Pollard H, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. 1993. Involvement of GABA_A receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 152:150–154.
- Becquet D, Hery M, Francois-Bellan AM, Giraud P, Deprez P, Faudon M, Fache MP, Hery F. 1993. Glutamate, GABA, glycine and taurine modulate serotonin synthesis and release in rostral and caudal rhombencephalic raphe cells in primary cultures. *Neurochem Int* 23:269–283.
- Bennett S, Gronier B. 2005. Modulation of striatal dopamine release in vitro by agonists of glycineB site of NMDA receptors; interaction with antipsychotics. *Eur J Pharmacol* 527:52–59.
- Du X, Iacovitti L. 1995. Synergy between growth factors and transmitters required for catecholamine differentiation in brain neurons. *J Neurosci* 15:5420–5427.
- Fiszman ML, Borodinsky LN, Neale JH. 1999. GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 115:1–8.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493–501.
- Guo H, Tang Z, Yu Y, Xu L, Jin G, Zhou J. 2002. Apomorphine induces trophic factors that support fetal rat mesencephalic dopaminergic neurons in cultures. *Eur J Neurosci* 16:1861–1870.
- Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P. 2000. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 20:5764–5774.
- Hilwig I, Gropp A. 1975. pH-dependent fluorescence of DNA and RNA in cytologic staining with “33258” Hoechst. *Exp Cell Res* 91:457–460.
- Jelitali M, Anderova M, Marko K, Kekesi K, Koncz P, Sykova E, Madarasz E. 2004. Role of gamma-aminobutyric acid in early neuronal development: Studies with an embryonic neuroectodermal stem cell clone. *J Neurosci Res* 76:801–811.
- Kim KM, Nakajima S, Nakajima Y. 1997. Dopamine and GABA receptors in cultured substantia nigra neurons: Correlation of electrophysiology and immunocytochemistry. *Neuroscience* 78:759–769.
- Lauder JM. 1993. Neurotransmitters as growth regulatory signals: Role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* 16:233–240.
- Li A, Guo H, Luo X, Sheng J, Yang S, Yin Y, Zhou J, Zhou J. 2006. Apomorphine-induced activation of dopamine receptors modulates FGF-2 expression in astrocytic cultures and promotes survival of dopaminergic neurons. *FASEB J* 20:1263–1265.
- Lindvall O, Bjorklund A. 2004. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 1:382–393.

- Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM. 1998. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol* 149:411–423.
- Liu J, Morrow AL, Devaud L, Grayson DR, Lauder JM. 1997. GABA_A receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro. *J Neurosci* 17:2420–2428.
- Luk KC, Sadikot AF. 2001. GABA promotes survival but not proliferation of parvalbumin-immunoreactive interneurons in rodent neostriatum: An in vivo study with stereology. *Neuroscience* 104:93–103.
- Michel PP, Ruberg M, Agid Y. 1997. Rescue of mesencephalic dopamine neurons by anticancer drug cytosine arabinoside. *J Neurochem* 69:1499–1507.
- Molander A, Soderpalm B. 2005. Glycine receptors regulate dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res* 29:17–26.
- Nguyen L, Malgrange B, Breuskin I, Bettendorff L, Moonen G, Belachew S, Rigo JM. 2003. Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J Neurosci* 23:3278–3294.
- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G. 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* 305:187–202.
- O'Brien JA, Berger AJ. 1999. Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 82:1638–1641.
- Owens DF, Kriegstein AR. 2002a. Developmental neurotransmitters? *Neuron* 36:989–995.
- Owens DF, Kriegstein AR. 2002b. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715–727.
- Pardo B, Paino CL, Casarejos MJ, Mena MA. 1997. Neuronal-enriched cultures from embryonic rat ventral mesencephalon for pharmacological studies of dopamine neurons. *Brain Res Protocols* 1:127–132.
- Parga J, Rodriguez-Pallares J, Munoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2006. Serotonin decreases generation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via serotonin type 7 and type 4 receptors. *J Neurobiol* 67:10–22.
- Parmar M, Skogh C, Bjorklund A, Campbell K. 2002. Regional specification of neurosphere cultures derived from subregions of the embryonic telencephalon. *Mol Cell Neurosci* 21:645–656.
- Potter ED, Ling ZD, Carvey PM. 1999. Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons. *Cell Tissue Res* 296:235–246.
- Riaz SS, Bradford HF. 2005. Factors involved in the determination of the neurotransmitter phenotype of developing neurons of the CNS: Applications in cell replacement treatment for Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 76:257–278.
- Riaz SS, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF. 2002. The controlled conversion of human neural progenitor cells derived from foetal ventral mesencephalon into dopaminergic neurons in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 136:27–34.
- Riaz SS, Spyridon T, Jauniaux, Stern GM, Bradford HF. 2004. The differentiation potential of human fetal neuronal progenitor cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 153:39–51.
- Rodriguez-Pallares J, Caruncho HJ, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2002. Dipyrindamole-induced increase in production of rat dopaminergic neurons from mesencephalic precursors. *Neurosci Lett* 320:65–68.
- Rodriguez-Pallares J, Caruncho HJ, Lopez-Real A, Wojcik S, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2001. Rat brain cholinergic, dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurons express GABA_A receptors derived from the alpha3 subunit. *Receptors Channels* 7:471–478.
- Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2003. Elimination of serotonergic cells induces a marked increase in generation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors. *Eur J Neurosci* 18:2166–2174.
- Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2005. Angiotensin II and interleukin-1 interact to increase generation of dopaminergic neurons from neurospheres of mesencephalic precursors. *Brain Res Dev Brain Res* 158:120–122.
- Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2004. Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci* 20:1489–1498.
- Rodriguez-Pallares J, Rey P, Soto-Otero R, Labandeira-Garcia JL. 2001. N-Acetyl-cysteine enhances production of dopaminergic neurons from mesencephalic-derived precursor cells. *Neuro Report* 12:3935–3938.
- Schlesinger F, Meywirth J, Krampfl K, Grosskreutz J, Petri S, Mauth C, Just L, Bader A. 2004. Bufler J. Ligand-gated channels in early mesencephalic neuronal precursors: Immunocytochemical and electrophysiological analysis. *Eur J Neurosci* 19:2371–2376.
- Varju P, Katarova Z, Madarasz E, Szabo G. 2001. GABA signalling during development: New data and old questions. *Cell Tissue Res* 305:239–246.
- Wang MZ, Jin P, Bumcrot DA, Marigo V, McMahon AP, Wang EA, Woolf T, Pang K. 1995. Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by Sonic hedgehog protein. *Nat Med* 1:1184–1188.
- Wang DD, Krueger DD, Bordey A. 2003. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABA_A receptor activation. *J Physiol* 550:785–800.
- Winkler C, Kirik D, Bjorklund A. 2005. Cell transplantation in Parkinson's disease: How can we make it work? *Trends Neurosci* 28:86–92.
- Wirtshafter D, Sheppard AC. 2001. Localization of GABA(B) receptors in midbrain monoamine containing neurons in the rat. *Brain Res Bull* 56:1–5.

4.3- La angiotensina II favorece la diferenciación de neuronas dopaminérgicas a partir de precursores mesencefálicos a través de receptores de angiotensina tipo 2.

Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2004) Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci* 20:1489-1498.

El sistema renina-angiotensina es conocido por sus acciones reguladoras en el control de la homeostasis y presión arterial. Sin embargo actualmente se sabe que el cerebro tiene un sistema renina-angiotensina propio e independiente. Aunque la mayor parte de las acciones de la AII en el cerebro son mediadas por receptores AT_1 , la elevada expresión de receptores AT_2 en etapas embrionarias sugiere un importante papel en el desarrollo y diferenciación del cerebro. En este trabajo estudiamos la función de AII en el desarrollo y diferenciación de células dopaminérgicas a partir de sus precursores.

Hemos observado receptores de angiotensina tipo 1 y tipo 2 (AT_1 y AT_2) en células diferenciadas a partir de neuroesferas en cultivo. Mediante estudios de doble inmunofluorescencia se puso de manifiesto que tanto astrocitos como neuronas (incluidas neuronas dopaminérgicas) mostraban inmunoreactividad para ambos receptores, siendo más intensa la reactividad para el AT_2 .

Cuando se diferenciaron estas células en presencia de AII durante una semana a una concentración de 100nM se produjo un aumento en el número de neuronas TH obtenidas con respecto a los cultivos control no tratados o con AII a menores concentraciones, y no se observó variación en el número de células GABA o 5-HT obtenidas.

El tratamiento con el antagonista de receptores AT_1 , ZD 7155, no produjo diferencias significativas en cuanto al número de células TH-ir obtenidas en cultivo. Por el contrario el antagonista del

receptor AT₂, PD 123319, no sólo revirtió el efecto de la AII en los agregados mesencefálicos, sino que provocó un incremento en la arborización y longitud neurítica de células dopaminérgicas. El tratamiento con el inhibidor mitótico AraC no provocó cambios en el número de células obtenidas en cultivos control o tratados con AII

Estudios de proliferación y supervivencia neuronal, mediante el uso de BrdU y marcaje con Hoechst o TUNEL, respectivamente, mostraron que el incremento en el número de células DAérgicas no era debido a un efecto de la AII en la replicación de los progenitores mesencefálicos ni a una mayor tasa de supervivencia DAérgica.

Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors

J. Rodriguez-Pallares, C. R. Quiroz, J. A. Parga, M. J. Guerra and J. L. Labandeira-Garcia

Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology, Department of Morphological Sciences, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Keywords: dopamine, Parkinson's disease, progenitor cells, rat, transplantation

Abstract

In addition to the well-known actions of the humoral renin–angiotensin system, all components of this system are present in many tissues, including the brain, and may play a major role in brain development and differentiation. We investigated the possible effects of angiotensin II on the generation of dopaminergic phenotype neurons from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors. We observed immunoreactivity for both angiotensin type 1 and type 2 (AT₁ and AT₂) receptors in the cell aggregates. Double immunolabeling studies revealed that both receptor types are located in neurons and astrocytes. Interestingly, neurons with a dopaminergic phenotype (i.e. tyrosine hydroxylase activity) showed double labeling for AT₁ and AT₂ receptors although the labeling for AT₂ was more intense. Treatment of the neurospheres with angiotensin II (100 nM) during the differentiation period induced a marked increase (about 400%) in the generation of dopaminergic neurons. This was not affected by treatment with the AT₁ antagonist ZD 7155 but was blocked by treatment with the AT₂ antagonist PD 123319. This suggests that AT₂ receptors mediate the stimulatory effect of angiotensin II on the generation of dopaminergic neurons. Apoptotic cell death studies and bromodeoxyuridine immunohistochemistry indicated that the increase in generation of dopaminergic neurons is not due to increased survival or proliferation of dopaminergic cells during treatment with angiotensin and suggested that angiotensin induces increased differentiation of mesencephalic precursors towards the dopaminergic phenotype. Manipulation of the renin–angiotensin system may be useful for increasing production of dopaminergic neurons for transplantation in Parkinson's disease.

Introduction

The mechanisms involved in the generation, differentiation and survival of dopaminergic (DA) neurons are of great interest, given that degeneration of these neurons is the cornerstone of Parkinson's disease. Furthermore, the understanding of these mechanisms may lead to a method for the large-scale production of DA neurons from stem/precursor cells which have a potential therapeutic application for transplantation in Parkinson's disease. Precursor cells can be isolated from the embryonic mesencephalic flexure, where DA neurons are formed during normal development, and proliferate in culture under serum-free conditions as floating neurospheres in response to mitogens such as epidermal growth factor (EGF). They spontaneously convert to neurons and glia following mitogen withdrawal but rarely express the DA neuron phenotype. The differentiation of precursor cells to DA neurons can be increased by extrinsic factors such as cytokines (Ling *et al.*, 1998; Potter *et al.*, 1999) and antioxidants (Studer *et al.*, 2000; Rodriguez-Pallares *et al.*, 2001) and also by factors and cell populations that act on the precursors during the normal development of DA neurons (Placzek *et al.*, 1993; Hynes *et al.*, 1995a,b; Hynes & Rosenthal, 1999). Recently, we have shown that the elimination of serotonergic cells induces a marked increase in the generation of DA

neurons from mesencephalic precursors (Rodriguez-Pallares *et al.*, 2003).

Angiotensin II (AII) is the most important effector peptide of the renin–angiotensin system. In addition to the traditional actions of the humoral renin–angiotensin system, it is now established that all components of the renin–angiotensin system are present in many tissues, including the brain (Stoll & Unger, 2001; McKinley *et al.*, 2003). The actions of AII are mediated by two cell surface receptors: AII type 1 and 2 (AT₁ and AT₂) receptors. The majority of the known actions of AII in the adult brain appear to be mediated by AT₁ receptors (Nuyt *et al.*, 2001), including the interactions of AII with the central DA system (Brown *et al.*, 1996; Jenkins *et al.*, 1997). During development, AT₂ receptors are much more abundant than AT₁ receptors and they decrease sharply in abundance after birth, suggesting that AT₂ receptors may play a major role in brain development and differentiation (Grady *et al.*, 1991; de Gasparo & Siragy, 1999; Nuyt *et al.*, 1999; Gallinat *et al.*, 2000; Stoll & Unger, 2001; Gendron *et al.*, 2003a). This is supported by the results of several studies conducted on neuronal cell lines (Laflamme *et al.*, 1996; Meffert *et al.*, 1996; Stroth *et al.*, 1998). However, the effect of AII on the neuronal development and differentiation of specific brain areas and neuronal systems remains unclear and the effect of AII on the development of the DA neurons, and particularly whether AII increases the generation of DA neurons from precursors, is not known.

In the present study, we investigated possible effects of AII on the generation of DA phenotype neurons from proliferating

Correspondence: Dr Jose L. Labandeira-Garcia, as above.
E-mail: cmlaband@usc.es

Received 4 March 2004, revised 1 July 2004, accepted 12 July 2004

neurospheres of mesencephalic precursors. We also studied whether these cells express AT₁ or AT₂ receptors and whether AT₁ or AT₂ receptors mediate the effects of AII on the generation of DA neurons.

Materials and methods

Isolation and culture of mesencephalic precursor cells

Mesencephalic precursor cells were obtained from Sprague-Dawley rat embryos of 14 days of gestation. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and approved by the corresponding committee of the University of Santiago de Compostela. Rats were deeply anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg). Ventral mesencephalic tissue was dissected from the embryos and incubated in 0.1% trypsin (Sigma, St Louis, MO, USA), 0.05% DNase (Sigma) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Paisley, UK) for 20 min at 37 °C. The tissue was rinsed in DNase/DMEM and mechanically dissociated. The resulting cell suspension was centrifuged at 50 *g* for 5 min, the supernatant fluid was carefully removed and the pellet resuspended in 0.05% DNase/DMEM to the final volume required. The number of viable cells in the suspension was estimated using acridine orange/ethidium bromide and cells were plated onto 35-mm culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) at a density of 5×10^{-3} cells/mL. Cells were maintained in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂; 37 °C). The proliferation medium was composed of HAMS F12/DMEM (1 : 3), B27 supplement (1 : 50; Gibco) and EGF (20 ng/mL; Sigma). After 7 days *in vitro* (DIV), dividing cells formed floating clusters (i.e. neurospheres) that were seeded into fresh expanding EGF-containing medium and maintained for another 7 days to obtain a second generation of neurospheres. After 2 weeks, neurospheres were gently triturated and plated onto culture dishes previously coated with poly L-lysine (1 mg/mL; Sigma) in the absence of EGF. Cells from each batch of neurospheres were divided into control cultures (i.e. untreated; group A) and cultures subjected to different treatments at plating (groups B–E) and processed in the same culture batch as follows. In control cultures (group A), the neurospheres were seeded in a differentiation culture medium composed of HAMS F12/DMEM (1 : 1) and 10% fetal bovine serum (Biocrom KG, Berlin, Germany). Group B cells were plated on to the differentiation medium supplemented with AII (1–1000 nM; Sigma). Group C cultures were seeded in the presence of the selective competitive AT₁ antagonist 5,7-diethyl-3,4-dihydro-1-[[2'-(1*H*-tetrazol-5-yl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl]-1,6-naphthyridin-2(1*H*)-one hydrochloride (ZD 7155 hydrochloride, 10^{-6} or 10^{-8} M; Tocris, Cookson Ltd, Bristol, UK) and AII (100 nM) or the same doses of ZD 7155 alone. In group D, neurospheres were seeded in the same differentiation medium containing the AT₂ antagonist (S-[+]-1-[(4-(dimethylamino)-3-methylphenyl)methyl]-5-[diphenylacetyl]-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-imidazol[4,5,6]pyridine-6-carboxylic acid) (PD 123139, 1 µM; Sigma) and AII (100 nM) or the same dose of PD 123177 alone. The AII antagonists (i.e. AT₁ antagonist ZD 7155 or AT₂ antagonist PD 123177) were added 16 h before adding the effective dose of AII. Group E cultures were seeded in the presence of a cell cycle inhibitor, the antimetabolic agent cytosine-β-D-arabino-furanoside (Ara-C, 1 µM; Sigma) and AII (100 nM) to inhibit the replication of non-neuronal cells or the same doses of Ara-C alone. Treatments were added to the medium for an incubation period of 7 days (i.e. 7 days of treatment). In addition, some group B culture dishes (i.e. treated with AII, 100 nM) and the corresponding controls were incubated for only 1, 2 or 4 DIV to study the effect of AII on the

generation of DA phenotype neurons at early stages of development of the cell aggregates.

Immunolabeling

Cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; pH 7.4) for 20 min and washed three times in DPBS. Cultures were preincubated with a blocking solution containing 10% normal serum in DPBS with 1% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100 (Sigma) for 1 h. The cultures were then incubated overnight at 4 °C with a mouse monoclonal anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (Sigma; 1 : 30 000), a rabbit polyclonal antibody against AT₁ receptor (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1 : 2000), a goat polyclonal anti-AT₂ receptor antibody (Santa Cruz Biotechnology; 1 : 250), a mouse monoclonal anti-β-tubulin III (Sigma; 1 : 400) or NeuN (Chemicon, Temecula, CA, USA; 1 : 2000) as neuronal markers, a mouse monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein (anti-GFAP; Chemicon; 1 : 1000) as a marker of astrocytes and a rabbit polyclonal anti-dopamine transporter (DAT; Chemicon; 1 : 50) as a DA marker. In addition, some group B culture dishes (i.e. treated for 7 DIV with AII, 100 nM) were incubated overnight with a rabbit polyclonal antibody against GABA (Sigma; 1 : 5000) or a rabbit polyclonal antibody against serotonin (Incstar, Stillwater, MN, USA; 1 : 7500). Cultures were then washed and incubated for 1 h with the corresponding biotinylated secondary antibody [horse anti-mouse (Sigma) for TH, swine anti-rabbit (DAKO, Glostrup, Denmark) for AT₁, GABA, serotonin and horse anti-goat (Vector, Burlingame, CA, USA) for AT₂] diluted 1 : 200. After washing, cultures were incubated for 90 min with avidin-biotin-peroxidase complex (Vector; 1 : 150). Finally, the labeling was revealed with 0.04% hydrogen peroxide and 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma).

Representative cultures were processed for double immunofluorescence against AT₁- or AT₂-receptors and NeuN or β-tubulin III, TH or GFAP to identify the AII receptor-expressing cells. In addition, selected cultures were processed for double immunofluorescence against TH and DAT to confirm the DA phenotype. Cultures were incubated overnight at 4 °C using the corresponding primary antibodies (NeuN, β-tubulin III, TH, GFAP or DAT) at double concentration (see above), containing 1% normal serum and 0.3% Triton X-100 diluted in DPBS-bovine serum albumin. After rinsing with DPBS, the cultures were incubated for 180 min with the corresponding secondary antibodies: goat anti-mouse conjugated with fluorescein isothiocyanate (Chemicon; 1 : 50) or rabbit anti-mouse conjugated with fluorescein isothiocyanate (Sigma; 1 : 50). For the second labeling, cultures were incubated for 48 h with the specific primary antibodies (AT₁, 1 : 500; AT₂, 1 : 100 and TH, 1 : 15 000). Cultures were washed and incubated using a secondary antibody, goat anti-rabbit conjugated with cyanine 3.18 (Chemicon; 1 : 250) or rabbit anti-goat conjugated with cyanine 3.18 (Chemicon; 1 : 500). To visualize the fluorescent labeling, we used a laser confocal microscope (TCS-SP2; Leica, Heidelberg, Germany) and a sequential scan method to avoid any possible overlap. In all experiments the control cultures, in which the primary antibody was omitted, were immunonegative for these markers.

Bromodeoxyuridine labeling

Bromodeoxyuridine (BrdU) staining was used as an index of DA cell replication. Cells from the control and AII-treated group (i.e. group B, 100 nM) were incubated in the corresponding differentiation medium with 1 µM BrdU (Sigma) for 7 DIV. The cells were then fixed,

incubated with 2 N CIH for 30 min at 37 °C and the acid was neutralized by washing in borate buffer (pH 8.9). Cells were processed for double immunofluorescence against TH (see above) and BrdU (Sigma; 1 : 20).

Apoptotic cell death measurement

The apoptotic cell death was determined in the control and AII-treated groups (i.e. group B, 100 nM) after 2 or 7 DIV. The total number of apoptotic cells was determined using the TUNEL assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA) performed by incubation with streptavidin conjugated with fluorescein isothiocyanate (Sigma; 1 : 250). Furthermore, representative cultures were processed for immunofluorescence against TH (see above) and then for the TUNEL assay to study the possible apoptotic cell death of TH-immunoreactive (TH-ir) cells.

Quantification and data analysis

Cells were always counted by the same investigator blinded to treatment history and using phase contrast or epifluorescence microscopy (Eclipse inverted microscope; Nikon, Tokyo, Japan) at 100 × magnification. In each experiment, we counted 15 culture dishes and 15 randomly chosen neurospheres per dish. A few culture dishes that

did not contain at least 15 neurospheres were excluded from counting. In each neurosphere, we estimated the number of labeled cells by focusing down through the neurosphere and counted all TH-ir cells that came into focus or all cells double labeled for TH and BrdU or TH and apoptosis markers. Finally, we estimated the volume of the neurospheres in the control and AII-treated cultures with the aid of NIH-IMAGE ANALYSIS software. All experiments were replicated at least three times using new groups of EGF-responsive mesencephalic precursor cells. The results were normalized to the counts of the control group of the same batch (i.e. expressed as a percentage of the control group counts) to counteract possible variability among batches. In addition, neurons from control groups and groups treated with AII and PD 123177 or PD 123177 alone (group D) were randomly selected and the lengths of primary processes of every neuron examined were measured with the aid of NIH-IMAGE ANALYSIS software. A minimum of 75 processes from three independent experiments was measured per treatment group. Clusters of cells were excluded and the length of a primary process was defined as the distance from the soma to the tip of the longest branch. Statistical differences between groups (mean ± SEM) were tested using one-way ANOVA followed by a posthoc Tukey test ($P < 0.05$). The normality of populations and homogeneity of variances were tested before each ANOVA. Statistical analysis was performed using SIGMASTAT 2.0 from Jandel Scientific (San Rafael, CA, USA).

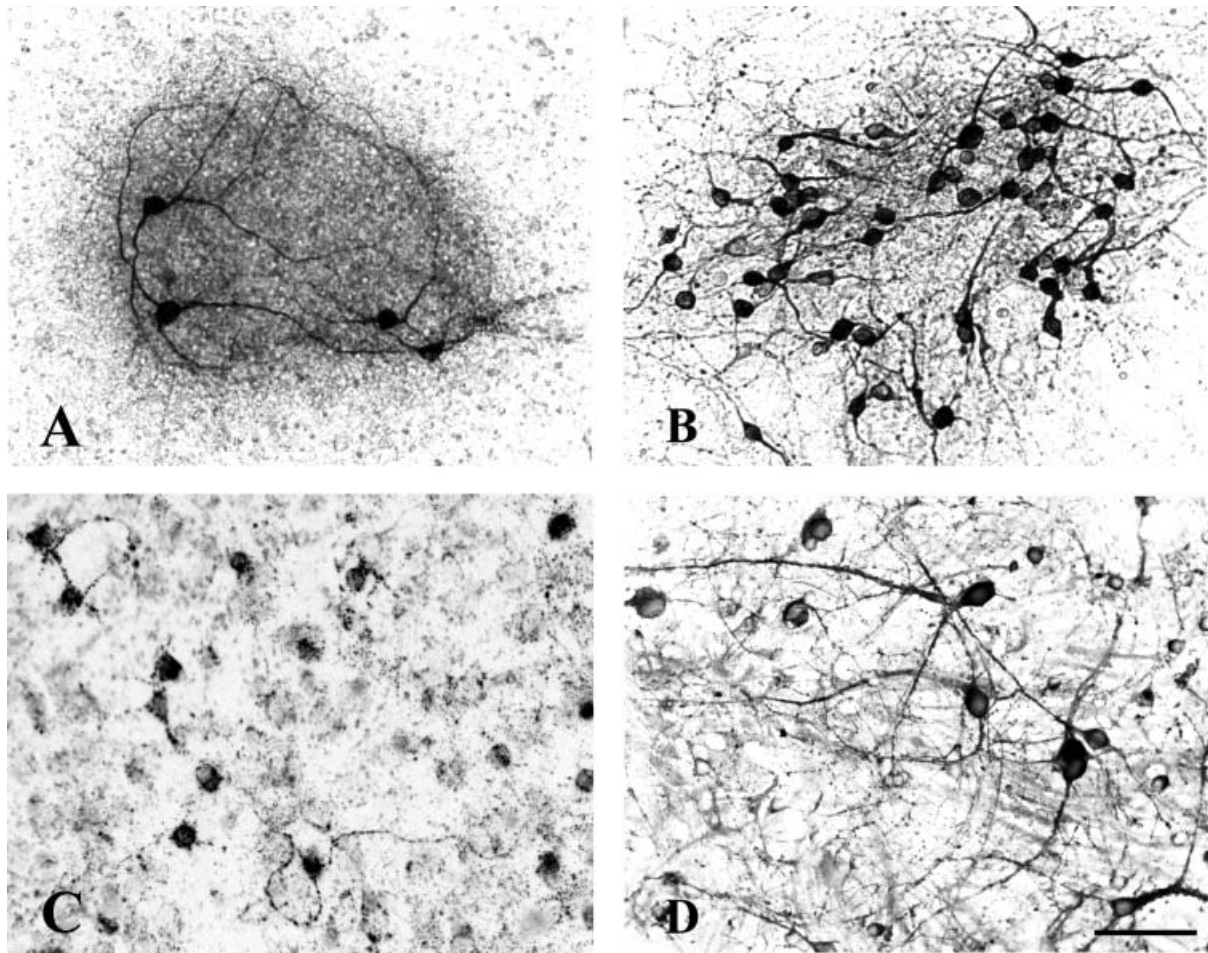


FIG. 1. Microphotographs of TH-ir (A and B), AT₁-ir (C) and AT₂-ir (D) cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursor cells. Cultures of precursor cells treated with AII (100 nM; B) contained more TH-ir cells per aggregate than the untreated control cell cultures (A). Most cells immunoreactive for AT₂ (D) showed intense labeling, while labeling for AT₁ was usually less intense and appeared as punctate cytoplasmic staining (C). Scale bar, 100 μm.

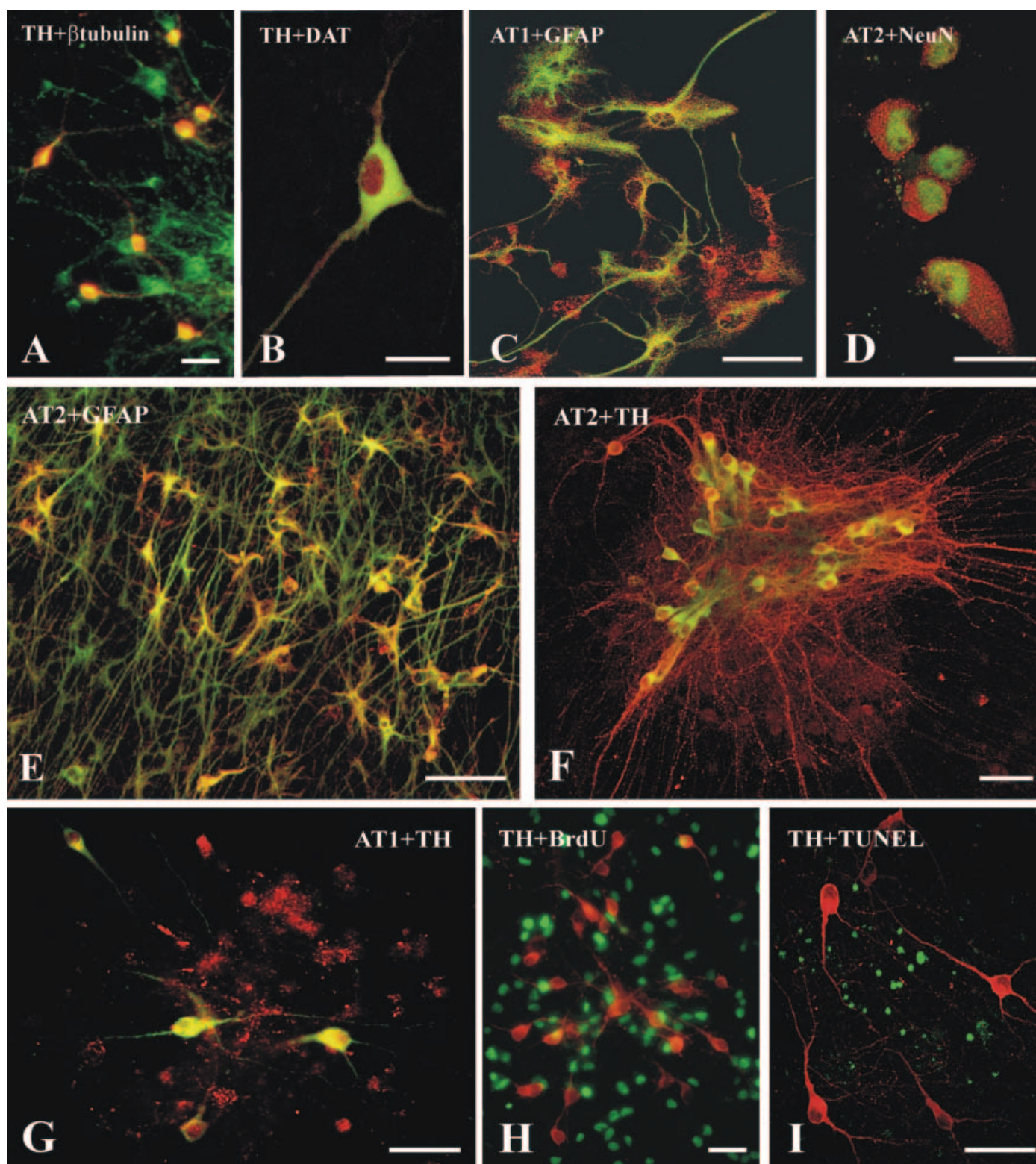


FIG. 2. Double immunofluorescence for TH (red) and β -tubulin III (green; A), TH (green) and DAT (red; B) or AT₁ receptor (red) and GFAP (green; C) or AT₂ receptor (red) and NeuN (green; D) or AT₂ (red) and GFAP (green; E) or AT₂ (red) and TH (green; F) or AT₁ (red) and TH (green; G) or TH (red) and bromodeoxyuridine (BrdU) (green; H) or TH (red) and TUNEL (green; I). TH-ir cells showed colocalization (yellow) of this marker and the neuronal marker β -tubulin III (A) as well as the DAT (B) and the AII receptors AT₂ (F) and AT₁ (G). Cells immunolabeled for AT₁ (red) were also labeled (yellow) for the astroglial marker GFAP (green; C). Cells labeled for AT₂ (red) were also labeled for the nuclear neuronal marker NeuN (D) or the astroglial marker GFAP (E). Cultures treated with AII and subjected to double immunofluorescence for TH (red) and BrdU (green; H) or TUNEL (green; I) did not show significant differences compared with controls. Scale bars, 50 μ m (A and E–I) and 25 μ m (B–D).

Results

Location of AT₁ and AT₂ receptors within the cell aggregates

The differentiation of the mesencephalic precursors was initiated by removal of the mitogen and addition of fetal bovine serum. After 7 days, cells differentiated from the proliferating neurospheres showed different morphologies. Most cells appeared as differentiated neurons or glia. However, numerous cells with undifferentiated morphology (i.e. rounded cell bodies without processes) were still present in the aggregates. Most TH-ir cells appeared as mature neurons with long and branching processes and only a few had an immature appearance (Fig. 1A and B). Immunohistochemistry for AII receptors revealed immunoreactivity for AT₁ and AT₂ receptors. The labeling was mostly observed in cell bodies but also in processes. Most cells immunoreactive for AT₂ showed intense labeling, while labeling for AT₁ was usually less intense and appeared as punctate cytoplasmic staining (Fig. 1C and D).

Double immunolabeling for TH and β -tubulin or NeuN revealed that TH-ir cells were also immunoreactive for the neuronal markers. Furthermore, immunoreactivity for the DAT was also observed in the TH-ir neurons (Fig. 2A and B). Double immunolabeling for AT₁ and

neuronal markers (i.e. NeuN or β -tubulin) or astroglial markers (i.e. GFAP) revealed that AT₁ receptors were located in both neurons and astrocytes (Fig. 2C–E). Similarly, AT₂ immunolabeling was located in both neurons and astrocytes. Finally, double immunolabeling for TH and AT₁ or AT₂ revealed that the DA neurons bore both AT₁ and AT₂ receptors (Fig. 2F and G).

Effect of AII on generation of TH-ir cells from neurospheres of mesencephalic precursor cells

Cultures treated for 7 DIV with AII (group B) showed significantly more TH-ir cells than the controls (group A). This effect was maximal at doses of 100 nM (about 360% of controls; Figs 1A and B, and 3A). No significant differences in the size of the neurospheres were observed between controls and groups treated with AII (Fig. 3B). Cultures treated with AII (100 nM) and incubated for only 1, 2 or 4 DIV showed an apparent increase in the number of TH-ir cells although this increase was only statistically significant in cultures incubated for 7 DIV (Fig. 3C). However, treatment with AII (100 nM, 7 DIV) did not induce significant changes in the number of GABAergic or serotonergic cells (Fig. 3D).

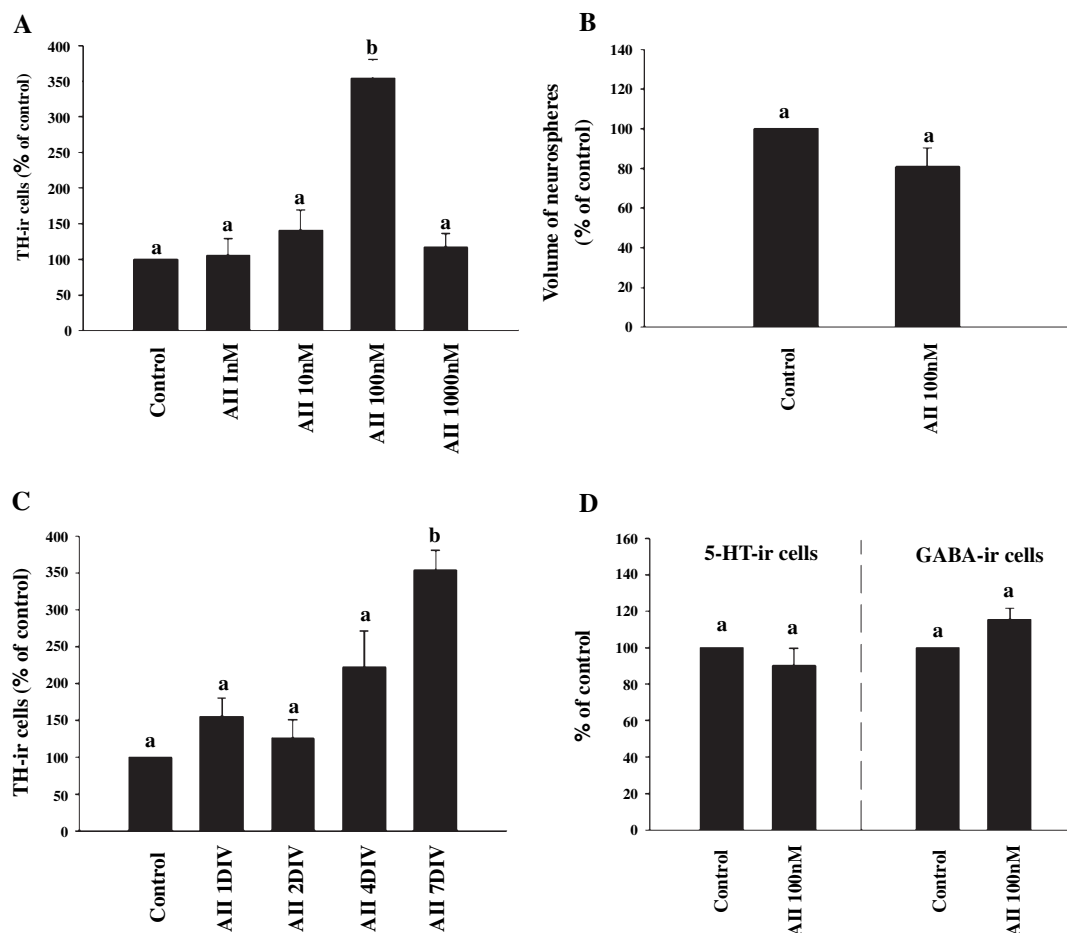


FIG. 3. Effects of treatment of neurospheres of mesencephalic precursors with AII. Seven days of treatment at doses of 100 nM induced a marked increase in the generation of TH-ir neurons (A) with no significant change in the size of the neurospheres (B). Cultures treated with AII (100 nM) for only 1–4 days *in vitro* (DIV) did not show a statistically significant increase in the number of TH-ir cells (C). Cultures treated with AII (100 nM, 7 DIV) did not show statistically significant changes in the number of serotonergic or GABAergic cells (D). The data are expressed as percentages of the number of TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that do not differ significantly are indicated by the same letter ($P < 0.05$, one-way ANOVA and posthoc Tukey tests). 5-HT, serotonin.

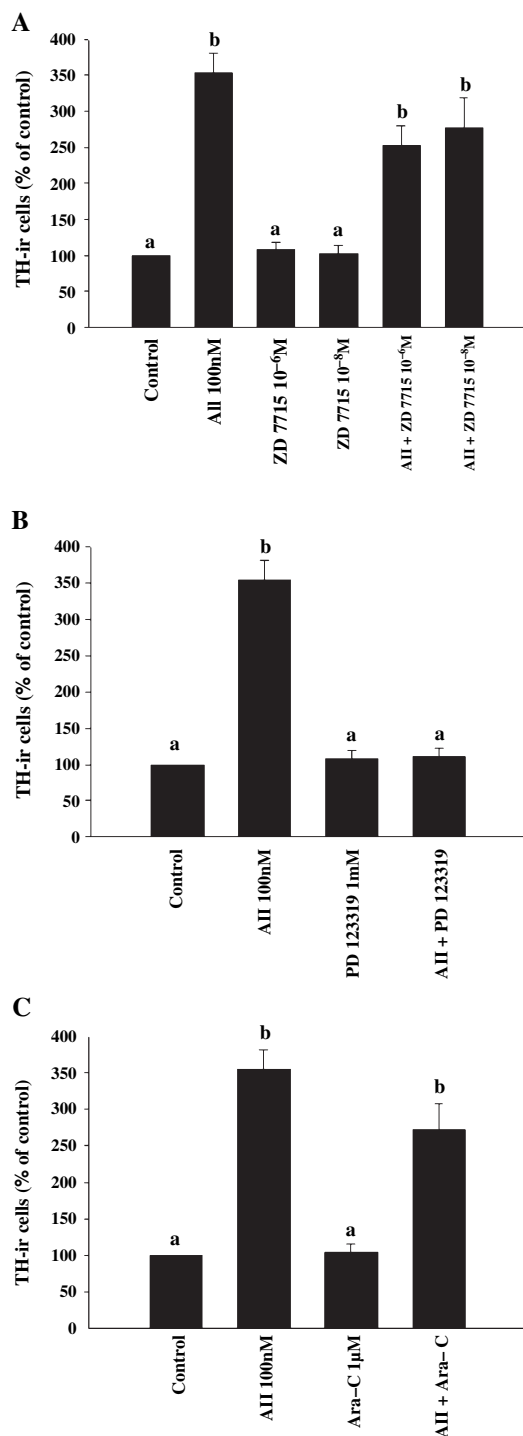


FIG. 4. Effects of 7 days of treatment with AII (100 nM) and/or the AT₁ antagonist ZD 7155 (A) or AII and/or the AT₂ antagonist PD 123319 (B) or AII and/or the antimitotic agent cytosine-β-D-arabino-furanoside (Ara-C) (C) on the number of TH-ir cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. Treatment with AII (100 nM) induced a marked increase in the generation of TH-ir neurons. This was not significantly affected by treatment with the AT₁ antagonist (A) or the antimitotic agent (C) but was blocked by treatment with the AT₂ antagonist (B). The data are expressed as percentages of the number of TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that do not differ significantly are indicated by the same letter ($P < 0.05$, one-way ANOVA and posthoc Tukey tests).

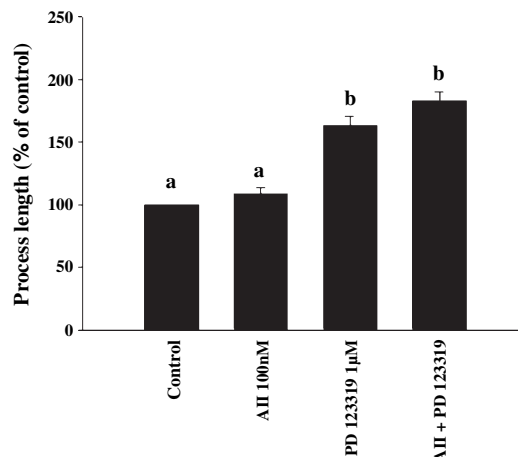


FIG. 5. Effect of the AT₂ antagonist PD 123319 (1 μ M) on the length of primary processes of the TH-ir cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. The AT₂ antagonist induced a significant increase in the length of the processes. The data are expressed as percentages of the measures obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that do not differ significantly are indicated by the same letter ($P < 0.05$, one-way ANOVA and posthoc Tukey tests).

Cultures in groups C and D were treated with different doses of the AT₁ receptor antagonist ZD 7155 or the AT₂ receptor antagonist PD 123319, respectively. Treatment with the AT₁ receptor antagonist alone (i.e. without AII) did not lead to a significantly greater number of TH-ir cells than observed in non-treated controls. Similarly, treatment with the AT₁ receptor antagonist did not prevent the AII-induced increase in the number of TH-ir cells (Fig. 4A). However, treatment with the AT₂ receptor antagonist PD 123319 (1 μ M) completely abolished the AII-induced increase in the number of TH-ir cells. Treatment with the AT₂ receptor antagonist alone (i.e. without AII) did not result in a significantly higher number of TH-ir cells than observed in non-treated controls (Fig. 4B). Finally, treatment with the antimitotic agent Ara-C (1 μ M) during the differentiation period did not prevent the AII-induced increase in the number of TH-ir cells (Fig. 4C). Interestingly, however, administration of the AT₂ antagonist PD 123319 either alone or with AII induced a significant increase in the length and branching of the processes of the TH-ir cells. However, no significant differences in the length and branching of the processes of the TH-ir cells were observed between controls and groups treated with AII (Figs 5 and 6).

Bromodeoxyuridine labeling and apoptotic cell death

In cultures incubated with BrdU for 7 days (i.e. during the differentiation period), a large number of cells incorporated BrdU. However, double TH and BrdU labeling revealed that only a few TH-ir cells incorporated BrdU in the control groups. In groups treated with AII during the differentiation period, there was a marked increase in the number of TH-ir cells (see above); however, we did not observe any significant increase in the number of cells showing double labeling for TH and BrdU (Figs 2H and 7A) which indicates that the AII-induced increase in the number of TH-ir cells compared with controls was not due to newly generated TH-ir cells.

Cultures treated with AII for 2 or 7 days and subjected to the TUNEL assay did not show significantly less apoptotic TH-ir cells than the corresponding control cultures (i.e. not treated with AII), suggesting that the AII-induced increase in TH-ir cells was not due to

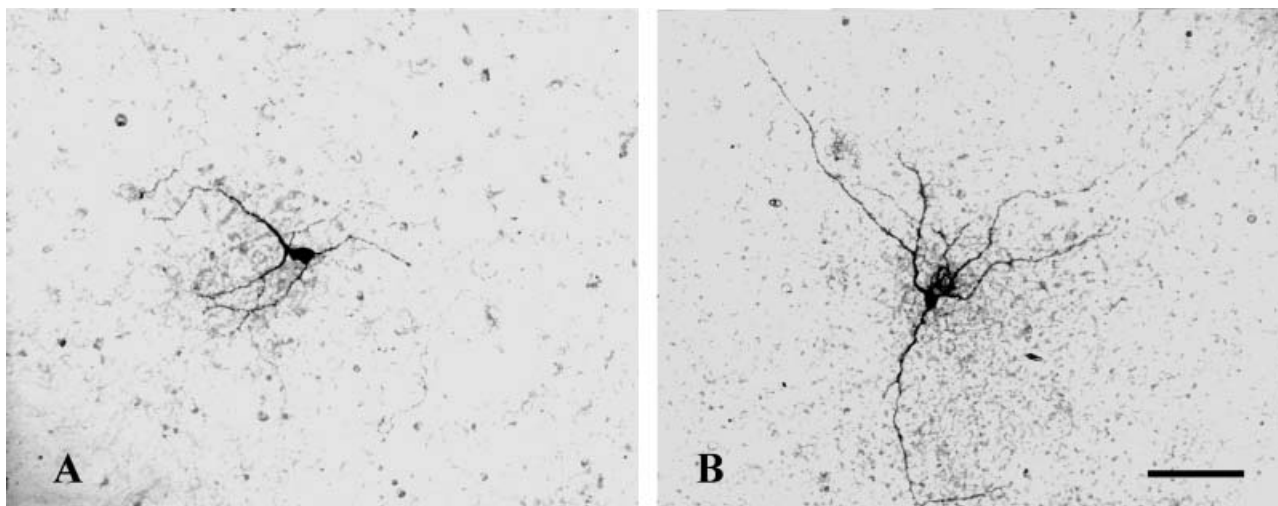


FIG. 6. Microphotographs of representative TH-ir cells from a control culture (A) and a culture treated with the AT_2 antagonist PD 123319 (1 μ M; B). The AT_2 antagonist induced a significant increase in the length of the processes. Scale bar, 100 μ m.

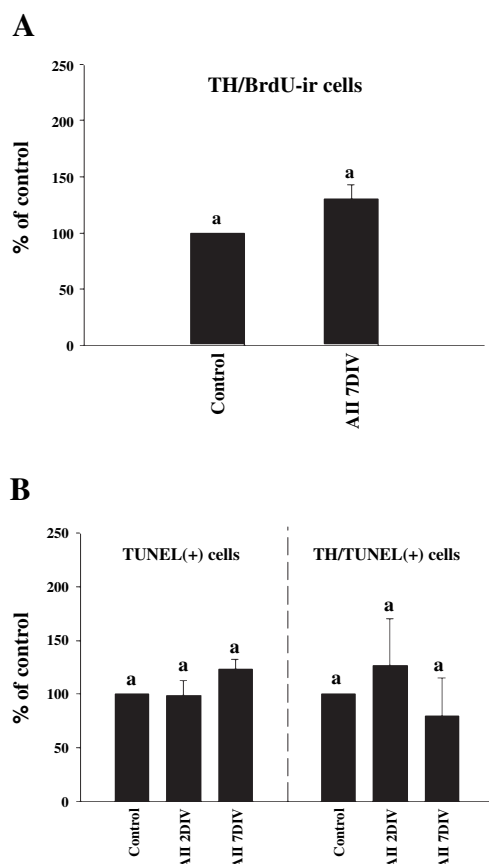


FIG. 7. Effects of treatment with AII on proliferation of TH-ir cell precursors [i.e. cells double labeled for TH and bromodeoxyuridine (BrdU); A] and on the total number of apoptotic cells (B) or the number of TH-ir apoptotic cells (i.e. cells double labeled for TH and TUNEL; B). The data are expressed as percentages of the total number of TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. Means that do not differ significantly are indicated by the same letter ($P < 0.05$, one-way ANOVA and posthoc Tukey tests). DIV, days *in vitro*.

an AII-induced reduction in apoptotic death of these cells (Figs 2I and 7B). In addition, there was no significant difference in the total number of apoptotic cells between controls and cultures treated with AII (Figs 7B and 8).

Discussion

The present results show that AII induces a marked increase (about 400%) in the number of TH-ir neurons generated from mesencephalic precursors. These TH-ir neurons were also immunoreactive for other DA markers such as DAT. Furthermore, we have shown that AT_2 receptors mediate this effect. Most of the known actions of AII in adult brains are mediated by AT_1 receptors, particularly those related to body fluid and cardiovascular homeostasis (Nuyt *et al.*, 2001). However, there is an overall predominance of AT_2 during fetal life, where AT_2 receptors appear to be up to 10 times more abundant than AT_1 (Grady *et al.*, 1991; de Gasparo & Siragy, 1999; Nuyt *et al.*, 1999; Stoll & Unger, 2001). After birth and with maturation from neonatal to adult stages in rats, the expression of AT_1 receptors either remains stable or increases and the expression and density of AT_2 receptors decrease sharply (Millan *et al.*, 1991; Schütz *et al.*, 1996). This high and transient expression of AT_2 receptors in fetal tissues, including brain tissue, indicates that they play a specific role during development and cellular differentiation (Grady *et al.*, 1991; de Gasparo & Siragy, 1999; Nuyt *et al.*, 1999; Stoll & Unger, 2001; Gendron *et al.*, 2003a). Furthermore, mice deficient in the AT_2 receptor gene show reductions in spontaneous locomotor activity and exploratory behaviour as well as hypoalgesia and other deficits (Ichiki *et al.*, 1995; Hein *et al.*, 1995). However, the role of AII and its receptors in the development of specific brain areas or neuron systems is largely unknown. Similarly, the localization of AT_1 and AT_2 receptors in neurons or glial cells in different brain areas has not been clarified.

Recent studies on the ontogeny of AII receptors in fetal and neonatal rat brain [i.e. between embryonic day 11 and postnatal day (P) 28] have detected AT_1 and AT_2 receptors in the substantia nigra compacta only after birth, showing low to moderate levels of AT_1 and AT_2 mRNA on P2, intense labeling on P7 and P28 and no labeling on the basal ganglia before P28 (Nuyt *et al.*, 1999, 2001). It is known that, in adult rats and particularly in humans, the nigrostriatal DA system bears AT_1 receptors, both on cell bodies in the substantia nigra

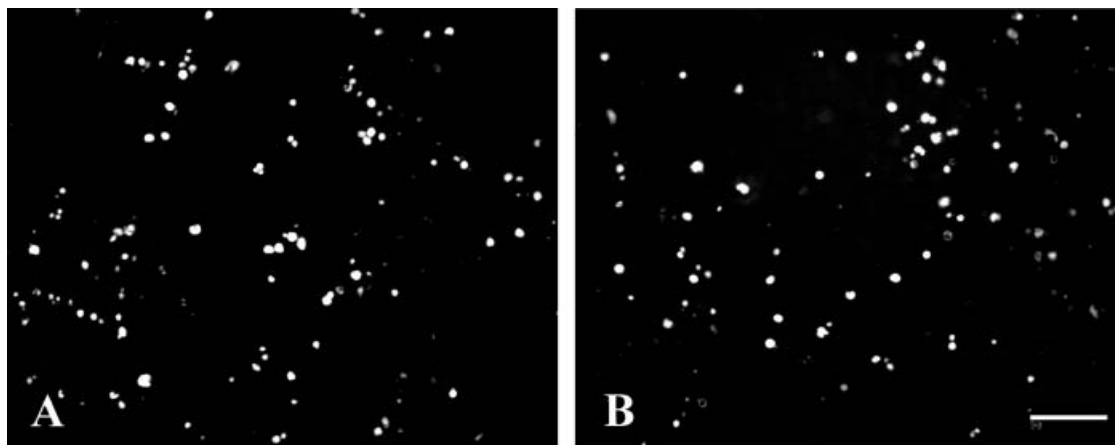


FIG. 8. Microphotographs of representative neurospheres from a culture treated with AII (100 nM, 7 days *in vitro*; A) and the corresponding control culture (B) processed for the TUNEL assay. There was no significant difference in the number of apoptotic cells. Scale bar, 200 μ m.

and their terminals in the striatum and that AII regulates central DA activity (Brown *et al.*, 1996; Jenkins *et al.*, 1997). Accordingly, the density of AT₁ receptors is markedly decreased in the striata of patients with Parkinson's disease (Allen *et al.*, 1992; Ge & Barnes, 1996). In the present experiments, we have observed both AT₁ and AT₂ receptors in cell aggregates obtained from proliferating neurospheres of mesencephalic precursors that were differentiated for 7 days. Double immunolabeling studies revealed that both AT₁ and AT₂ receptors are located in neurons and astrocytes. Interestingly, TH-ir neurons showed double labeling for AT₁ and AT₂ receptors, although the labeling for AT₂ was more intense.

Treatment with AII (100 nM) during the differentiation period induced a marked increase in the generation of DA neurons from precursors. This effect was not affected by treatment with the AT₁ receptor antagonist ZD 7155 but was blocked by treatment with the AT₂ receptor antagonist PD 123319. This suggests that AT₂ receptors mediate the stimulatory effect of AII on the generation of DA neurons. Interestingly, treatment with ZD 7155 or PD 123319 alone (i.e. without AII) did not significantly affect the number of DA neurons generated from precursors suggesting that, *in vitro*, the endogenous AII does not reach the levels necessary to significantly affect the generation of DA neurons from precursors. However, after treatment with the AT₂ receptor antagonist PD 123319, either alone or with AII, we observed no increase in the number of TH-ir neurons but these neurons showed a significant increase in the length of processes. The effects of AII on the neurite outgrowth of cultured neurons are controversial. It has been reported that AII inhibits neurite outgrowth (Moeller *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1996), AII stimulates neurite outgrowth by activation of AT₁ receptors (Yang *et al.*, 2002) and AII stimulates neurite outgrowth by activation of AT₂ receptors (Laflamme *et al.*, 1996; Meffert *et al.*, 1996; Cote *et al.*, 1998, 1999; Stroth *et al.*, 1998). In addition, it has been observed that AII, via its AT₂ receptor, promotes axonal regeneration after sciatic nerve (Gallinat *et al.*, 1998; Reinecke *et al.*, 2003) or optic nerve (Lucius *et al.*, 1998) crush in adult rats. It has been suggested that the effect of the AT₂ receptors is highly sensitive to (or dependent on) the cellular environment (Gendron *et al.*, 2003a) and it is possible that the differences were the result of additional local factors and particularly depended on the cell type and the ratio between the expression of AT₁ and AT₂ receptors. Studies of different tissues have suggested that AT₁ and AT₂ counteract each other with respect to growth-modulating actions (Gelband *et al.*, 1997; Abdalla *et al.*, 2001; Stoll & Unger, 2001). It

has been suggested that cell growth and proliferation are mediated by AT₁ receptors, whereas AT₂ receptors inhibit cell proliferation and induces cell differentiation (de Gasparo & Siragy, 1999; Gallinat *et al.*, 2000; Gendron *et al.*, 2003a). Interestingly, AII induced the outgrowth of neurites in non-differentiated NG108-15 cells which express only AT₂ receptors; however, AII induced neurite involution in differentiated NG108-15 cells, where both AT₁ and AT₂ receptors are present (Laflamme *et al.*, 1996; Gendron *et al.*, 2002). In the present study, treatment with the AT₂ receptor antagonist may have facilitated the neurite outgrowth mediated by AT₁ as both receptors were observed in the TH-ir neurons.

The increase in the number of TH-ir neurons obtained from precursors may be related to an increase in the generation of the DA phenotype from precursor cells but also to an increase in the survival of cells with the DA phenotype. Neuronal AT₂ receptors have been reported to be involved in preventing neuronal apoptosis (Grammatopoulos *et al.*, 2002) but also in the stimulation of apoptotic cell death (Shenoy *et al.*, 1999). Whether apoptosis or survival takes place probably depends on the specific combination of local factors and on the cell type. The data obtained in the present experiments using the TUNEL assay do not suggest that the increase in the number of TH-ir neurons after treatment with AII is due to an increase in the survival of TH-ir neurons. We measured apoptosis not only at the end of the experimental treatment (7 DIV) but also at an early period (i.e. 2 DIV). This was to study the possibility that AII decreased apoptosis early in the differentiation process and the apoptotic cells were cleared from the aggregates before 7 DIV. Furthermore, apoptosis was also measured in non-TH-ir cells and there were no significant differences between controls and AII-treated groups. The increase in the number of TH-ir neurons appears to be related to an increase in the generation of TH-ir neurons. This may be due either to an increased proliferation of precursors of DA neurons or to an increase in differentiation of DA neurons from mesencephalic precursor cells. Although AII has been reported to induce proliferation of some cell types (Rodgers *et al.*, 2000), our data from BrdU immunohistochemistry suggest that there is no significant increase in the proliferation of the TH-ir cells during the differentiation period in cultures treated with AII (i.e. during treatment with AII). Furthermore, treatment with the antimitotic agent Ara-C did not prevent the AII-induced increase in TH-ir cells. Therefore, our results suggest that AII acts by stimulating the differentiation of mesencephalic precursors towards the DA phenotype. A decrease in the number of other types of neurons, such as GABAergic neurons or,

particularly, serotonergic neurons, could provide additional indirect evidence in support of AII acting by stimulating the differentiation of mesencephalic precursors towards the DA phenotype. However, we did not observe significant changes in the number of GABAergic or serotonergic cells. Other populations of cells derived from mesencephalic precursors may be decreased. It is particularly interesting that we did not observe significant changes in the number of serotonergic cells after treatment with AII. We have recently shown that the elimination of serotonergic cells induces a marked increase in the generation of DA neurons (Rodríguez-Pallares *et al.*, 2003). Therefore, an AII-induced decrease in the number of serotonergic cells may be responsible for the increase in the number of DA neurons.

As the astrocytes also express AT₂ receptors, AII could be exerting an indirect effect on the phenotype of the neurons via a direct action on astrocytes that results in the production of factors that regulate the induction of TH-ir neurons. However, it is well known that Ara-C treatment leads to an important reduction of the number of astrocytes in cultures and treatment with Ara-C did not prevent the AII-induced increase in the number of TH-ir cells. This does not support a major role of astrocytes in the above-described effect of AII. The signaling pathways of the AT₁ receptor are largely understood (Phillips & Sumners, 1998; Blume *et al.*, 1999). However, AT₂ receptor-coupled signal transduction is controversial. This seven-transmembrane domain receptor is not coupled to any of the classical second messengers, such as cAMP or inositol phosphates, and its coupling to the G α_1 protein is controversial (Gendron *et al.*, 1999, 2002, 2003a,b; Gallinat *et al.*, 2000; Nouet & Nahamias, 2000; Stroth *et al.*, 2000; Stoll & Unger, 2001; Sumners *et al.*, 1991). It has been suggested that, similar to the AT₁ receptor, the AT₂ receptor can modulate a number of different signaling mechanisms, depending on the cell/tissue type (for review see Gallinat *et al.*, 2000; Gendron *et al.*, 2003a). The signaling pathways used by AT₂ receptors of mesencephalic precursors will be studied in our laboratory in the near future using a different experimental design.

In conclusion, the present results show that mesencephalic precursors bear angiotensin receptors and that AII increases the differentiation of precursors towards DA neurons via AT₂ receptors. Manipulation of the renin-angiotensin system components, such as administration of AII during the differentiation period, may be an effective method of increasing the production of DA neurons from precursors/stem cells. Different methodological approaches have led to the generation *in vitro* of cells expressing DA cell markers and releasing DA, although these cells are frequently unable to survive for a long time *in vivo* after transplantation and/or induce functional effects in the host brain. However, it has been shown that grafted DA neurons from expanded mesencephalic precursors survive after transplantation and can alleviate behavioral deficits in animal models of Parkinson's disease (Studer *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002). In addition, we have grafted cell aggregates treated with AII in the DA-denervated striata of rats subjected to unilateral 6-hydroxydopamine lesion and observed well-developed grafts of DA neurons which reinnervated the surrounding striatum and reduced the amphetamine-induced rotational asymmetry (Rodríguez-Pallares and Labandeira-Garcia, unpublished observations). Interestingly, AT₂ receptor expression may be upregulated by adding other factors such as insulin-like factor or interleukin 1b (Ichiki & Inagami, 1995; Kambayashi *et al.*, 1996). It is well known that interleukin 1 induces a marked increase in the number of DA neurons generated from mesencephalic precursors (Ling *et al.*, 1998; Potter *et al.*, 1999). The combination of such manipulation of renin-angiotensin system components with different factors that increase the specification, maturation or survival of DA

neurons (see for review Martínez-Serrano *et al.*, 2001; Isacson, 2003) may lead to large-scale production of these cells for clinical transplantation in the treatment of Parkinson's disease.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish MCYT and XUGA.

Abbreviations

AII, angiotensin II; Ara-C, cytosine- β -D-arabino-furanoside; AT₁, angiotensin type 1 receptor; AT₂, angiotensin type 2 receptor; BrdU, bromodeoxyuridine; DA, dopaminergic; DAT, dopamine transporter; DIV, days *in vitro*; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; EGF, epidermal growth factor; ir, immunoreactive; P, postnatal day; TH, tyrosine hydroxylase.

References

- Abdalla, S., Lother, H., Abdel-tawab, A.M. & Quitterer, U. (2001) The angiotensin II AT₂ receptor is an AT₁ receptor antagonist. *J. Biol. Chem.*, **276**, 39 721–39 726.
- Allen, A.M., MacGregor, D.P., Chai, S.Y., Donnan, G.A., Kaczmarzyk, S., Richardson, K., Kalnins, R., Ireton, J. & Mendelsohn, F.A.O. (1992) Angiotensin II receptor binding associated with nigrostriatal dopaminergic neurons in human basal ganglia. *Ann. Neurol.*, **32**, 339–344.
- Blume, A., Herdegen, T. & Unger, T. (1999) Angiotensin peptides and inducible transcription factors. *J. Mol. Med.*, **77**, 339–357.
- Brown, D.C., Steward, L.J., Ge, J. & Barnes, N.M. (1996) Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via AT₁ receptor *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 414–420.
- Cote, F., Laflamme, L., Payet, M.D. & Gallo-Payet, N. (1998) Nitric oxide, a new second messenger involved in the action of the angiotensin II on neuronal differentiation of NG108-15 cells. *Endocr. Res.*, **24**, 403–407.
- Cote, F., Do, T.H., Laflamme, L., Payet, M.D. & Gallo-Payet, N. (1999) Activation of the AT₂ receptor of angiotensin II induces neurite outgrowth and cell migration in microexplant cultures of cerebellum. *J. Biol. Chem.*, **274**, 31 686–31 692.
- Gallinat, S., Yu, M., Dorst, A., Unger, T. & Herdegen, T. (1998) Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT₂ and AT₁ receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **57**, 111–122.
- Gallinat, S., Busche, S., Raizada, M.K. & Sumners, C. (2000) The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **278**, E357–E374.
- de Gasparo, M. & Siragy, H.M. (1999) The AT₂ receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul. Pept.*, **81**, 11–24.
- Ge, J. & Barnes, N.M. (1996) Alterations in angiotensin AT₁ and AT₂ receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders. *Eur. J. Pharmacol.*, **297**, 299–306.
- Gelband, C.H., Zhu, M., Lu, D., Reagan, L.P., Fluharty, S.F., Posner, P., Raizada, M.K. & Sumners, C. (1997) Functional interactions between neuronal AT₁ and AT₂ receptors. *Endocrinology*, **138**, 2195–2198.
- Gendron, L., Laflamme, L., Rivard, N., Asselin, C., Payet, M.D. & Gallo-Payet, N. (1999) Signals from the AT₂ (angiotensin type 2) receptor of angiotensin II inhibit p21^{ras} and activate MAPK (mitogen-activated protein kinase) to induce morphological neuronal differentiation in NG108-15 cells. *Mol. Endocrinol.*, **13**, 1615–1626.
- Gendron, L., Cote, F., Payet, M.D. & Gallo-Payet, N. (2002) Nitric oxide and cyclic GMP are involved in angiotensin II AT₂ receptor effects on neurite outgrowth in NG108-15 cells. *Neuroendocrinology*, **75**, 70–81.
- Gendron, L., Payet, M.D. & Gallo-Payet, N. (2003a) The angiotensin type 2 receptor of angiotensin II and neuronal differentiation: from observations to mechanisms. *J. Mol. Endocrinol.*, **31**, 359–372.
- Gendron, L., Oligny, J.F., Payet, M.D. & Gallo-Payet, N. (2003b) Cyclic AMP-independent involvement of Rap1/B-Raf in the angiotensin II AT₂ receptor signaling pathway in NG108-15 cells. *J. Biol. Chem.*, **278**, 3606–3614.
- Grady, E.F., Seci, L.A., Griffin, C.A., Schambelam, M. & Kalinyak, J.E. (1991) Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest.*, **88**, 921–933.

- Grammatopoulos, T., Morris, K., Ferguson, P. & Weyhenmeyer, J. (2002) Angiotensin protects cortical neurons from hypoxic-induced apoptosis via the angiotensin type 2 receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **99**, 114–124.
- Hein, L., Barsh, G.S., Pratt, R.E., Dzau, V.J. & Kobilka, B.K. (1995) Behavioral and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mice. *Nature*, **377**, 744–747.
- Hynes, M. & Rosenthal, A. (1999) Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **9**, 26–36.
- Hynes, M., Porter, J.A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P.A. & Rosenthal, A. (1995a) Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic Hedgehog. *Neuron*, **80**, 95–101.
- Hynes, M., Poulsen, K., Tessier-Lavigne, M. & Rosenthal, A. (1995b) Control of neuronal diversity by the floor plate: contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell*, **80**, 95–101.
- Ichiki, T. & Inagami, T. (1995) Transcriptional regulation of the mouse angiotensin type II receptor gene. *Hypertension*, **25**, 720–725.
- Ichiki, T., Labosky, P.A., Shiota, C., Okuyama, S., Imagawa, I., Fogo, A., Niimura, F., Ichikawa, I., Hogan, B.L.M. & Inagami, T. (1995) Effects of blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature*, **377**, 748–750.
- Isacson, O. (2003) The production and use of cells as therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.*, **2**, 417–424.
- 1498 J. Rodríguez-Pallares *et al.* Jenkins, T.A., Mendelsohn, F.A.O. & Chai, S.Y. (1997) Angiotensin-converting enzyme modulates dopamine turnover in the striatum. *J. Neurochem.*, **68**, 1304–1311.
- Kambayashi, I., Nagaka, K., Ichiki, T. & Inagami, T. (1996) Insulin and insulin-like growth factor-induced expression of angiotensin type 2 receptor in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Biochem.*, **239**, 558–565.
- Kim, J., Auerbach, J.M., Rodriguez-Gomez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumeisky, N., Lee, S., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. & McKay, R. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, **418**, 50–56.
- Laflamme, L., de Gasparo, M., Payet, M.D. & Gallo-Payet, N. (1996) Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT₂ receptors in NG108-15 cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 729–735.
- Ling, Z.D., Potter, E.D., Lipton, J.W. & Carvey, P.M. (1998) Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp. Neurol.*, **149**, 411–423.
- Lucius, R., Gallinat, S., Rosenstiel, P., Herdegen, T., Sievers, J. & Unger, T. (1998) The angiotensin II type 2 receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J. Exp. Med.*, **188**, 661–670.
- Martinez-Serrano, A., Rubio, F.J., Navarro, B., Bueno, C. & Villa, A. (2001) Human neural stem and progenitor cells: in vitro and in vivo properties, and potential for gene therapy and cell replacement in the CNS. *Curr. Gene Ther.*, **1**, 279–299.
- McKinley, M.J., Albiston, A.L., Allen, A.M., Mathai, M.L., May, C.N., McAllen, R.M., Oldfield, B.J., Mendelsohn, F.A.O. & Chai, S.Y. (2003) The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **35**, 901–918.
- Meffert, S., Stoll, M., Steckelings, U.M., Bottari, S.P. & Unger, T. (1996) The angiotensin AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **122**, 59–67.
- Millan, M.A., Jacobowitz, D.M., Aguilera, G. & Catt, K.J. (1991) Differential distribution of AT₁ and AT₂ angiotensin II receptor in the rat brain during development. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 1140–1144.
- Moeller, I., Small, D.H., Reed, G., Harding, J.W., Mendelsohn, F.A.O. & Chai, S.Y. (1996) Angiotensin IV inhibits neurite outgrowth in cultured embryonic chicken sympathetic neurons. *Brain Res.*, **725**, 61–66.
- Nouet, S. & Nahamias, C. (2000) Signal transduction from the angiotensin AT₂ receptor. *Trends Endocrinol. Metab.*, **11**, 1–6.
- Nuyt, A.N., Lenkei, Z., Corvol, P., Palkovits, M. & Llorens-Cortés, C. (1999) Ontogeny of angiotensin II type 2 receptor mRNAs in fetal and neonatal rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **407**, 193–206.
- Nuyt, A.N., Lenkei, Z., Corvol, P., Palkovits, M. & Llorens-Cortés, C. (2001) Ontogeny of angiotensin II type 1 receptor mRNAs in fetal and neonatal rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **440**, 192–203.
- Phillips, M.I. & Summers, C. (1998) Angiotensin II in the central nervous system physiology. *Regul. Pept.*, **78**, 1–11.
- Placzek, M., Jessell, M. & Dodd, J. (1993) Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. *Development*, **117**, 205–218.
- Potter, E.D., Ling, Z.D. & Carvey, P.M. (1999) Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons. *Cell. Tissue Res.*, **296**, 235–246.
- Reed, G., Moeller, I., Mendelsohn, F.A.O. & Small, D.H. (1996) A novel action of angiotensin peptides in inhibiting neurite outgrowth from isolated chick sympathetic neurons in culture. *Neurosci. Lett.*, **210**, 209–212.
- Reinecke, K., Lucius, R., Reinecke, A., Rickert, U., Herdegen, T. & Unger, T. (2003) Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT₂ receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J.*, **17**, 2094–2096.
- Rodgers, K.E., Steer, R. & diZerega, G.S. (2000) Effect of angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation. *Stem Cells*, **18**, 287–294.
- Rodríguez-Pallares, J., Rey, P., Soto-Otero, R. & Labandeira-Garcia, J.L. (2001) N-Acetyl-cysteine enhances production of dopaminergic neurons from mesencephalic-derived precursor cells. *Neuroreport*, **12**, 3935–3938.
- Rodríguez-Pallares, J., Guerra, M.J. & Labandeira-Garcia, J.L. (2003) Elimination of serotonergic cells induces a marked increase in generation of dopaminergic cells in neurospheres. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 2166–2174.
- Schütz, S., Le Moullec, J.M., Corvol, P. & Gasc, J.M. (1996) Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development. *Am. J. Pathol.*, **149**, 2067–2079.
- Shenoy, U.V., Richards, E.M., Huang, X.-C. & Summers, C.E. (1999) Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. *Endocrinology*, **140**, 500–509.
- Stoll, M. & Unger, T. (2001) Angiotensin and its AT₂ receptor: new insights into an old system. *Regul. Pept.*, **99**, 175–182.
- Stroth, U., Meffert, S., Gallinat, S. & Unger, T. (1998) Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells — role of AT₂ receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **53**, 187–195.
- Stroth, U., Blume, A., Mielke, K. & Unger, T. (2000) Angiotensin AT₂ receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **78**, 175–180.
- Studer, L., Tabar, V. & McKay, R.D.G. (1998) Transplantation of expanded precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat. Neurosci.*, **1**, 290–295.
- Studer, L., Csete, M., Sang-Hun, L., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B. & McKay, R. (2000) Enhanced proliferation, survival and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J. Neurosci.*, **20**, 7377–7383.
- Summers, C., Tang, W., Zelezna, B. & Raizada, M.K. (1991) Angiotensin II receptor subtypes are coupled with distinct signal-transduction mechanisms in neurons and astrocytes from rat brain. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 7567–7571.
- Yang, H., Shaw, G. & Raizada, M.K. (2002) Ang II stimulation of neurogenesis involves protein kinase B in brain neurons. *Am. J. Physiol. Regulat. Integrat. Comp. Physiol.*, **283**, R107–R114.

4.4- Efectos distintos de anticuerpos anti-sonic hedgehog y el inhibidor de la ruta de hedgehog ciclopamina sobre la generación de neuronas dopaminérgicas a partir de neurosféricas de precursores mesencefálicos.

Parga JA, Rodriguez-Pallares J, Blanco V, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2008) Different effects of anti-sonic hedgehog antibodies and the hedgehog pathway inhibitor cyclopamine on generation of dopaminergic neurons from neurospheres of mesencephalic precursors. *Dev Dyn* 237:909-917.

Sonic hedgehog es uno de los principales morfógenos implicados en la organización, distribución espacial y diferenciación del sistema nervioso en desarrollo, especialmente involucrado en la determinación de las estructuras ventrales. En este estudio analizamos el efecto que tiene sobre la diferenciación de precursores neurales procedentes del mesencéfalo ventral en desarrollo.

Estudios inmunocitoquímicos mostraron la expresión de Shh y del marcador de placa basal FP4 en neurosféricas diferenciadas obtenidas a partir de precursores mesencefálicos proliferados in vitro. En estas mismas neurosféricas fue posible localizar abundantes neuronas DAérgicas, 5-HTérgicas y GABAérgicas que se disponen alrededor del núcleo central de células FP4-ir.

Sorprendentemente, el tratamiento de las neurosféricas en diferenciación con un anticuerpo neutralizante de Shh provocó un descenso en el número de células 5-HT-ir y GABA-ir, pero el número de células TH-ir se vio incrementado.

La ciclopamina es un inhibidor de la cascada de señalización característica de Shh. El tratamiento durante la diferenciación con este fármaco no mostró efectos sobre el número de las células investigadas, a pesar de que mediante PCR se observó que inhibía de forma efectiva esta ruta en nuestros cultivos. Tampoco la tomatidina, análogo estructural de la ciclopamina pero

sin efecto en la ruta de señalización de Shh, provocó cambios en el tamaño poblaciones neuronales estudiadas.

Different Effects of Anti-Sonic Hedgehog Antibodies and the Hedgehog Pathway Inhibitor Cyclopamine on Generation of Dopaminergic Neurons From Neurospheres of Mesencephalic Precursors

J.A. Parga, J. Rodriguez-Pallares, V. Blanco, M. J. Guerra, and J. L. Labandeira-Garcia*

Production of dopaminergic neurons from stem/precursor cells for transplantation in Parkinson's disease has become a major focus of research. However, the inductive signals mediating this process have not been clarified. Reported data on the effects of Sonic hedgehog on differentiation of dopaminergic and serotonergic neurons from cultures of neural precursors are controversial. In the present study, cultures of proliferating neurospheres of mesencephalic precursors treated with anti-sonic hedgehog antibodies showed significantly less serotonergic and GABAergic cells and a markedly higher number of dopaminergic neurons generated from the neurospheres than control cultures. Treatment of the neurospheres with cyclopamine, which selectively inhibits sonic hedgehog signaling by preventing Smoothened activation, did not induce significant changes in generation of serotonergic and dopaminergic neurons. This suggests that Smoothened activation is not significantly involved in the above-mentioned effects and that sonic hedgehog may exert effects on the mesencephalic precursors that do not involve the canonical Patched-Smoothened-Gli signaling. *Developmental Dynamics* 237:909–917, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Sonic hedgehog; dopamine; serotonin; progenitor cells; cell therapy; Parkinson's disease

Accepted 18 January 2008

INTRODUCTION

The mechanisms involved in generation, differentiation, and survival of dopaminergic (DA) neurons are of great interest, as degeneration of these neurons is the cornerstone of Parkinson's disease. Furthermore, the understanding of these mechanisms may lead to a method for large-scale production of DA neurons from stem/precursor cells, which have potential

therapeutic application for transplantation in Parkinson's disease. Neural stem or precursor cells (Studer et al., 1998; Wagner et al., 1999; Kim et al., 2003; Rodriguez-Pallares et al., 2005b; Riaz and Bradford, 2005) as well as embryonic cells (Lee et al., 2000; Björklund et al., 2002; Takagi et al., 2005; Iacovitti et al., 2007) have been proposed as alternatives to primary fetal tissue for transplantation.

Precursor cells can be isolated from the embryonic mesencephalic flexure, where DA neurons are formed during normal development, and proliferate in culture under serum-free conditions as floating neurospheres in response to mitogens such as epidermal growth factor (EGF). They spontaneously convert to neurons and glia following mitogen withdrawal, but only a small number of cells express the

Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology, Department of Morphological Sciences, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, and Centro de Investigación Biomedica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Santiago de Compostela, Spain

Grant sponsor: XUGA; Grant number: PGIDT04BTF208018PR; Grant sponsor: Ministerio de Educación y Ciencia; Grant number: BFU2006-07414/BFI; Grant sponsor: Ministerio de Sanidad y Consumo; Grant number: RD06/0010/0013 and Ciberned.

*Correspondence to: Jose L. Labandeira-Garcia, M.D., Ph.D., Dept. of Morphological Sciences, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain. E-mail: cmlaband@usc.es

DOI 10.1002/dvdy.21481

Published online 10 March 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DA neuron phenotype. Differentiation of precursor cells to DA neurons can be increased by extrinsic factors such as cytokines (Ling et al., 1998; Potter et al., 1999; Rodriguez-Pallares et al., 2004, 2005a) and antioxidants (Studer et al., 2000; Rodriguez-Pallares et al., 2001), and also by factors that act on the precursors during normal development of DA neurons (Placzek et al., 1993; Hynes et al., 1995a,b; Hynes and Rosenthal, 1999; Rodriguez-Pallares et al., 2003).

Sonic Hedgehog (Shh) is a soluble signaling protein that was originally described for its ability to regulate limb and spinal cord patterning (see Ho and Scott, 2002). However, Shh also regulates the differentiation of DA and serotonergic neurons in the midbrain (Hynes et al., 1995a,b; Wang et al., 1995; Ye et al., 1998). Furthermore, Shh may promote the survival of these neurons and other cells such as midbrain GABAergic neurons (Miao et al., 1997; Charytoniuk et al., 2002). A complex of two membrane proteins Patched (Ptc) and Smoothened (Smo) has been suggested to transduce Shh signals (Alcedo et al., 1996; Wallace, 1999). In the absence of its ligand, Ptc might block the pathway, whereas Shh binding to Ptc would relieve this inhibition, thus activating downstream intracellular levels (see Marti and Bovolenta, 2002; Riobo and Manning, 2002). It has been observed, however, that cues that are effective *in vivo* may be less effective in promoting the DA phenotype in culture. Reported data on the effects of Shh in enhancing differentiation of DA or serotonergic fates from ES are controversial (Lee et al., 2000; Takagi et al., 2005), and Shh administration has been reported to be ineffective in enhancing differentiation of DA neurons from later precursors (Ostenfeld et al., 1999; Sakurada et al., 1999; Svendsen et al., 1999; Lee et al., 2000; Stull and Iacovitti, 2001). However, Shh may already be produced by precursors present in the neurospheres/aggregates, and may regulate the developmental fate of these and of neighboring cells (Rafuse et al., 2005). In the present study, we investigated the effect of Shh inhibition by Shh antibodies and by the Shh pathway inhibitor cyclopamine on generation of DA neurons from neurospheres of

mesencephalic precursors. We also studied the effects on the serotonergic and GABAergic cell populations derived from the neurospheres.

RESULTS

Differentiation of the mesencephalic precursors was initiated by removal of the mitogen. After 7 days, cells differentiated from the proliferating neurospheres showed different morphologies (Figs. 1 and 2A,C,E). Most cells appeared as differentiated neurons or glia. However, numerous cells of undifferentiated morphology (i.e., rounded cell bodies without processes) were still present in the aggregates. Numerous Shh-ir cells were observed, most of them concentrated in the central core of the neurospheres (Fig. 1I). Most dopaminergic (i.e., tyrosine hydroxylase-immunoreactive, TH-ir) cells appeared as mature neurons with long and branching processes, and only a few had an immature appearance. Double immunolabeling for TH and the floor plate cell marker FP4 showed that TH-ir cells appeared within or in close proximity to a central FP4-ir core. This was particularly evident after 1 or 2 DIV (not shown; see Rodriguez-Pallares et al., 2003). Then, most of the TH-ir cells were concentrated peripherally forming a cap that surrounded the central FP4-ir area (Fig. 1C,F). Numerous GABA-ir cells were also observed (see Parga et al., 2007, for details; Fig. 1B,E). Double immunolabeling for FP4 and serotonin showed that serotonergic cells appeared within or in close proximity to the central FP4-ir core, and then migrated to form a cap in the periphery of the aggregate (Fig. 1A,D). Double TH and serotonin immunolabeling revealed that most of the serotonergic cells and their network of serotonergic fibers formed a cap surrounding that of TH-ir neurons (Fig. 1G,H).

Cultures treated with anti-Shh antibodies showed a significant reduction (around 40–50% decrease) in the number of serotonergic and GABAergic cells generated from the proliferating neurospheres (Figs. 1A,B,D,E, 2A–D, 3A,B). However, treatment with anti-Shh antibodies induced a marked increase in generation of TH-ir neurons (around 250–300%; Figs. 1C,F, 2E,F, 3C). These results

were confirmed with 3 different concentrations of antibody (1:200, 1:100, and 1:50). No significant differences were observed in control cultures treated with vehicle (i.e., hybridoma supernatant, NS1 conditioned medium Fig. 3A–C).

Cultures treated with cyclopamine, which selectively inhibits Shh signaling by preventing Smo activation, did not show significant changes in the number of DAergic, GABAergic, or serotonergic cells. In a first series of experiments, cyclopamine was added to the plating medium and no significant changes were observed in the number of TH-ir cells. In a second series of experiments, cyclopamine was added daily to the medium, and again no significant changes in the number of TH-ir cells were observed (Figs. 4 and 5). Control cultures treated with tomatidine (structural analog of cyclopamine that lacks a significant inhibitory effect on hedgehog signaling) did not show any significant differences in the number of DAergic, GABAergic, or serotonergic cells (Fig. 5A–C). However, real-time quantitative RT-PCR of Gli-1 mRNA levels confirmed the inhibitory effect of cyclopamine (5 μ M) on the Patched-Smothened-Gli signaling pathway in the cultures (Fig. 5D).

DISCUSSION

The molecular mechanisms directing the development of midbrain DA and rostral serotonergic neurons *in vivo* are still poorly understood. However, experiments with explant culture systems have demonstrated that the secreted factors fibroblast growth factor 8 (FGF8) and Shh are required for the induction of these cells during early embryogenesis (Ye et al., 1998). A complex of two membrane proteins (i.e., Ptc and Smo), which display homology with members of transporters and G protein-coupled receptors, respectively, has been suggested to transduce Shh signals (Charytoniuk et al., 2002; Marti and Bovolenta, 2002). In vertebrates, the Gli family of zinc finger transcription factors, including Gli1, Gli2, and Gli3, has been proposed as being responsible for the activation and repression of the Hedgehog target genes in developing tissues, particularly at the level of the

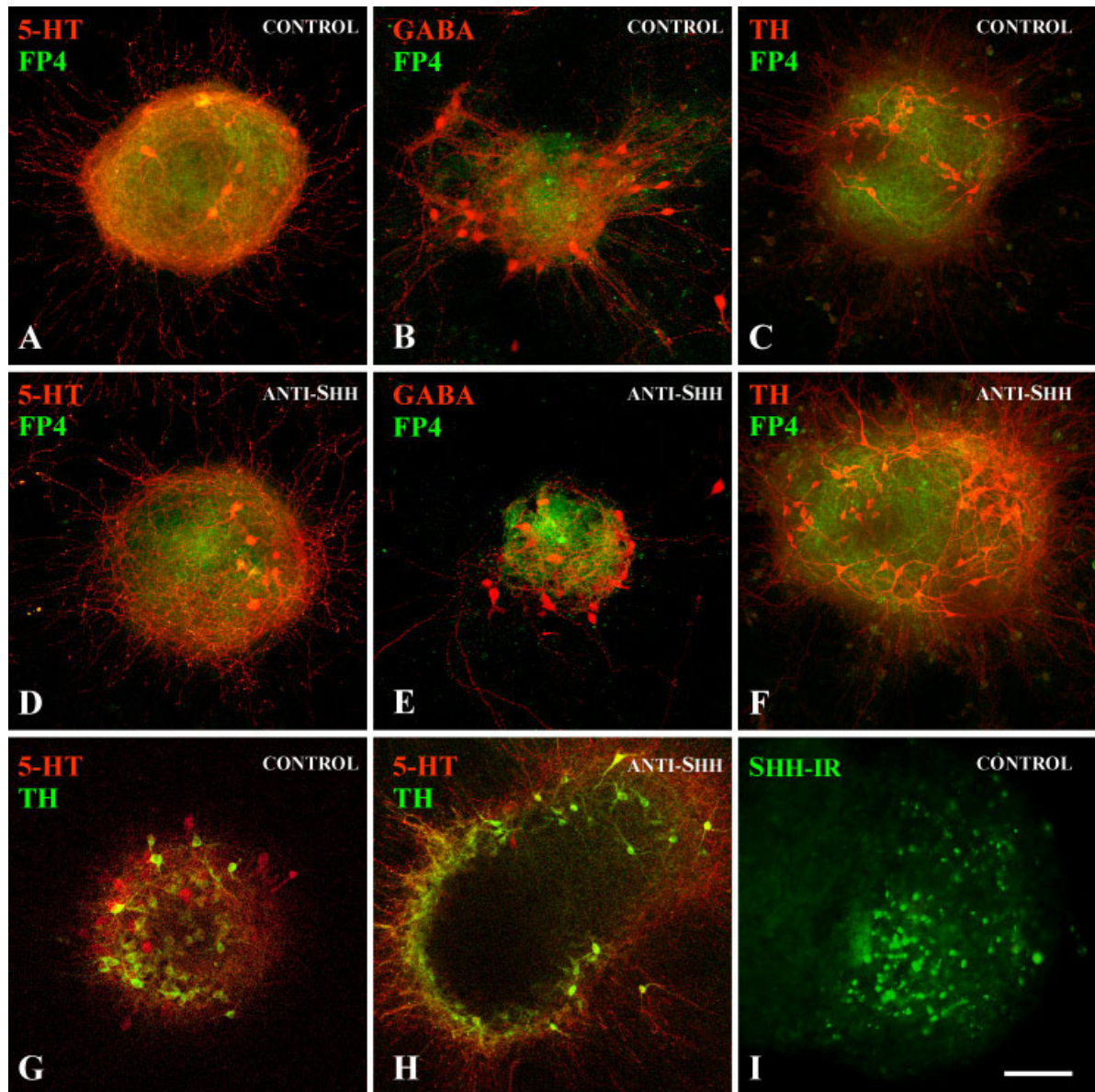


Fig. 1. Photomicrographs of neurospheres obtained with laser confocal microscopy and double immunolabeling for FP4 and serotonin (5-HT; **A,D**), FP4 and GABA (**B,E**), FP4 and TH (**C,F**), or TH and 5-HT (**G,H**) in control cultures (**A–C, G**) and cultures treated with anti-Shh antibody (**D–F, H**). TH-ir cells (red in **C** and **F**; green in **G** and **H**) appeared within or in close proximity to a central FP4-ir core (green in **C** and **F**), and then the TH-ir cells migrated to concentrate in a cap surrounding the central FP4-ir core. 5-HT-ir cells also appeared in close proximity to the central FP4-ir core, and then migrated to form a peripheral cap surrounding the central FP4-ir area (**A,D**) and the cap of TH-ir cells (**G,H**). GABA-ir cells also appeared surrounding the central FP4-ir area (**B, E**). Numerous Shh-ir cells were observed, most of them concentrated in the central core of the neurospheres (**I**). Scale bar = 150 μ m (**A–H**) and 100 μ m (**I**).

neural tube (Hynes et al., 1997; Ruiz i Altaba, 1998). Furthermore, it has been observed that Shh promotes the survival of several types of midbrain postmitotic neurons (Miao et al., 1997). In the present study, a decrease in the number of DA and serotonergic neurons generated from neurospheres of mesencephalic precursors treated with anti-Shh antibodies may, therefore, have been expected. However, we observed a significant decrease in the

number of serotonergic and GABAergic cells and an increase in TH-ir neurons.

Several previous studies have reported that administration of exogenous Shh does not enhance in vitro differentiation of DA neurons from neurospheres of neural precursors (Ostenfeld et al., 1999; Sakurada et al., 1999; Svendsen et al., 1999; Lee et al., 2000; Stull and Iacovitti, 2001). However, this may be due to the fact

that Shh may already be produced by the neural precursor cells, thereby regulating the developmental fate of these and the neighboring cells (Rafuse et al., 2005). In the present and previous studies (Rodriguez-Pallares et al., 2003), we observed that the aggregates obtained from proliferating mesencephalic precursors show a differentiation pattern resembling that observed in the developing neural tube (Placzek and Briscoe, 2005; Abe-

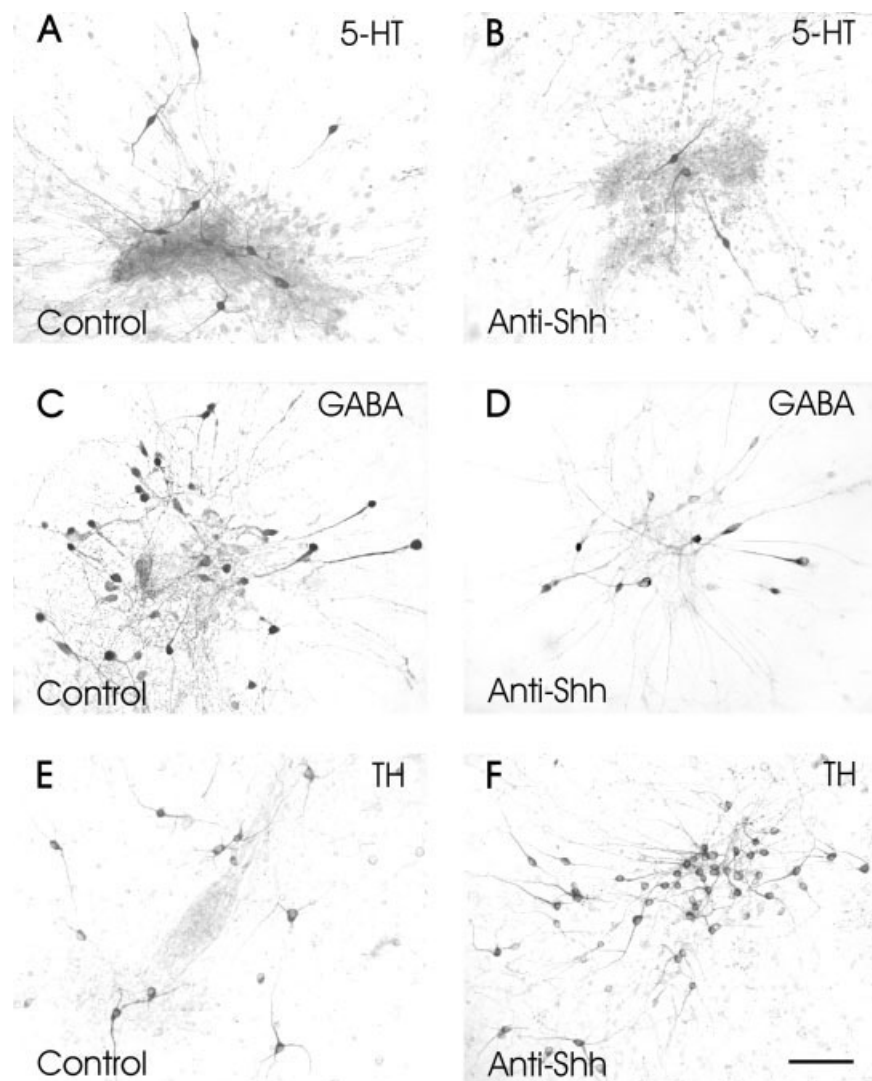


Fig. 2. Bright-field photomicrographs of serotonergic (5-HT-ir; **A,B**), GABAergic (**C,D**), and dopaminergic (TH-ir; **E,F**) neurons labeled by single immunohistochemistry. The labeled neurons were located in the periphery of cell aggregates representative of control cultures (**A,C,E**) and cultures treated with anti-Shh antibodies (**B,D,F**). Cultures treated with antibodies showed a significant decrease in the number of serotonergic (**B**) and GABAergic (**D**) neurons. However, cultures treated with anti-Shh antibodies contained more TH-ir cells (**F**) than the non-treated control cultures (**E**). Scale bar = 100 μ m.

liovich and Hammond, 2007). Soon after plating, the aggregates consisted mainly of cells that were immunoreactive for the floor plate marker FP4, and practically no TH-ir cells were observed. TH-ir cells then appeared within or in close proximity to a central FP4-ir core, and finally concentrated peripherally forming a cap that surrounded the FP4-ir area. Similarly, the serotonergic cells also appeared within or in close proximity to a central FP4-ir core, and finally formed a cap surrounding that of TH-ir neurons (Rodríguez-Pallares et al., 2003). It has been suggested that Shh may pattern cells in which is

transiently expressed, and Ptc may bind Shh present in the synthesizing cell and activate Smo in a non-cell-autonomous way (Hynes et al., 2000; Riobo and Manning, 2007). In the present study, numerous Shh-ir cells were observed in the neurospheres, most of them located in the central core. Therefore, the Shh synthesized by FP4-ir mesencephalic precursors may be sufficient to induce TH-ir and serotonergic cells, and administration of exogenous Shh may not induce additional effects. The results obtained after treatment of the cultures with anti-Shh antibodies suggest that endogenous Shh plays a role in the gen-

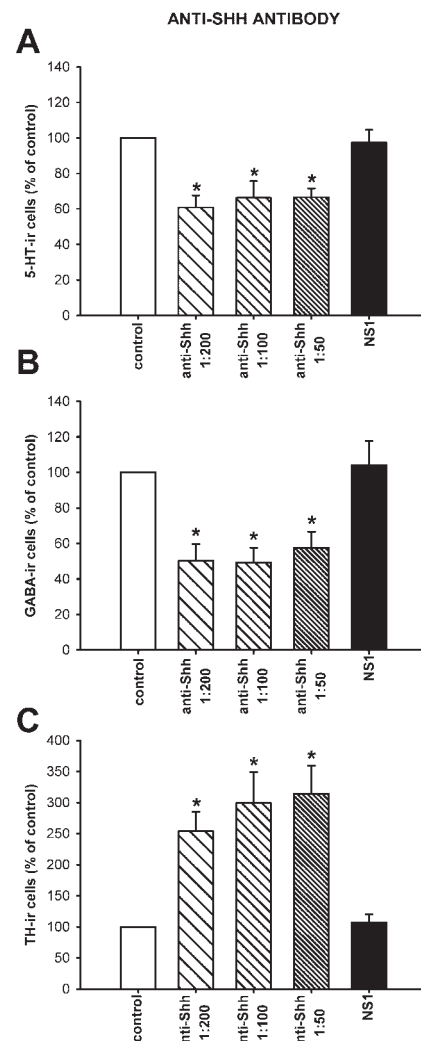


Fig. 3. Effects of treatment with different doses of anti-Shh antibodies on the number of serotonergic (5-HT-ir; **A**), GABAergic (**B**), and dopaminergic (TH-ir; **C**) cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. The generation of 5-HT-ir and GABAergic cells was reduced by treatment with anti-Shh antibodies, but the generation of TH-ir cells was significantly increased. Control cultures treated with vehicle (i.e., NS1 conditioned medium, supernatant) did not induce any significant change. The data are expressed as percentages of the number of 5-HT-ir, GABAergic, or TH-ir cells obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control group (i.e., untreated cells; one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test).

eration of serotonergic, GABAergic and dopaminergic cells from mesencephalic precursors. It has previously been observed that Shh is not only involved in early specification of precursors for serotonergic neurons (Ye et al., 1998), but also promotes survival of serotonergic and GABAergic post-

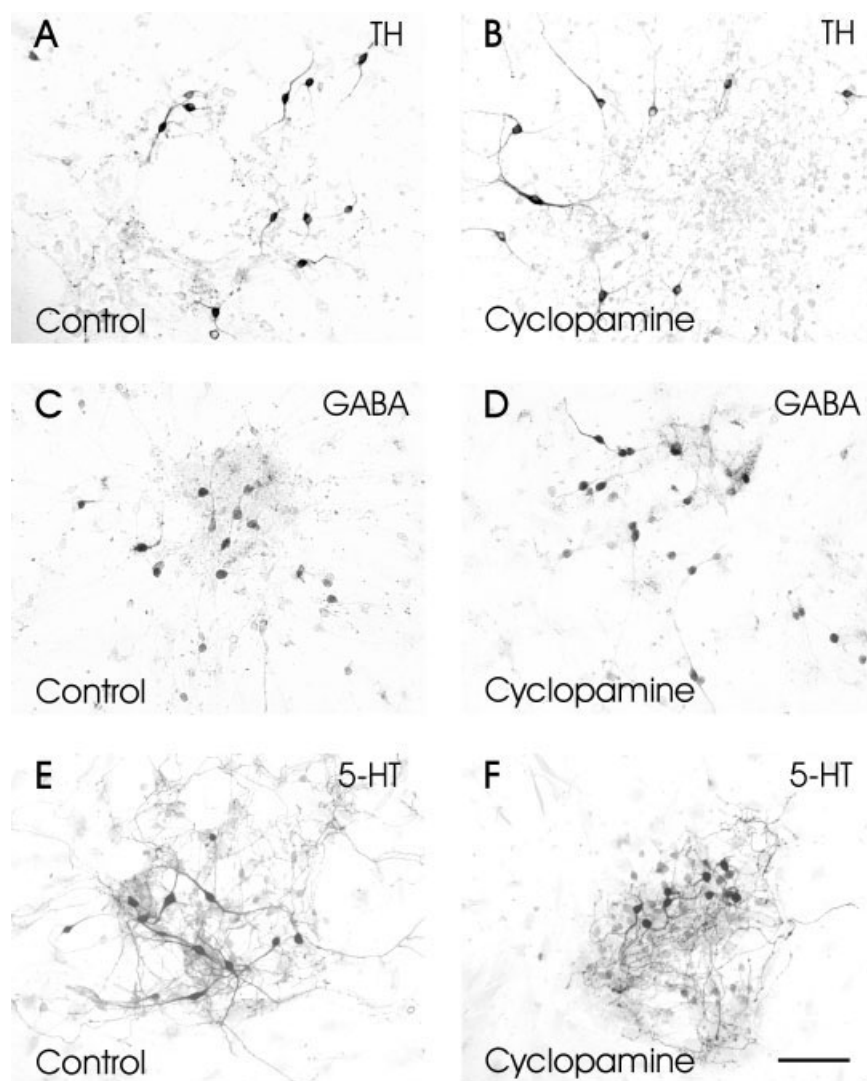


Fig. 4. Bright-field microphotographs of dopaminergic (TH-ir; **A,B**), GABAergic (**C,D**), or serotonergic (5-HT-ir; **E,F**) neurons labeled by single immunohistochemistry. The labeled neurons were located in the periphery of cell aggregates representative of control cultures (**A,C,E**) and cultures treated with the hedgehog pathway inhibitor cyclopamine (**B,D,F**). Cyclopamine did not induce significant changes in the number of dopaminergic or serotonergic cells. Scale bar = 100 μ m.

mitotic neurons (Miao et al., 1997; Rafuse et al., 2005), which may further explain the decrease in the number of these neurons observed in the present study. This cannot explain, however, the observed increase in the number of TH-ir cells, in which several mechanisms may be involved. Firstly, it has been suggested that although Shh may be required beyond the final cell cycle for differentiation in other cell types (Ericson et al., 1996), Shh may be not necessary (Hynes et al., 1995; Wang et al., 1995), or may exert inhibitory effects (Sakurada et al., 1999) in late postmitotic DA differentiation. A possible conflict between Shh signaling and the protein kinase A pathway

has been suggested, since forskolin, an adenylate cyclase activator, is a potent inhibitor of Shh signaling, and is highly effective in promoting the generation of TH-positive neurons from precursors (Hynes et al., 1995; Sakurada et al., 1999). However, it has also been reported that Shh may promote survival of postmitotic DA and serotonergic neurons as a trophic factor (Miao et al., 1997). In the latter scenario, the cells closest to the central FP4-positive core (i.e., DA cells) may be less affected than more peripheral cells (i.e., serotonergic cells) by an incomplete blockage of Shh by the antibodies. The Ptc expressed in DA cells may sequester and thus im-

pede the further diffusion of Shh into the peripheral areas of the neurosphere containing the serotonergic cells (Chen and Struhl, 1996; Chen et al., 2004). In any case, the decrease in generation of serotonergic neurons may at least in partly cause the increase in the number of TH-ir neurons observed in the neurospheres. We have recently shown that serotonin decreases generation of dopaminergic neurons in neurospheres of mesencephalic precursors via glial serotonin type 7 and type 4 receptors (Parga et al., 2006), and that a reduction in the number of serotonergic cells in the neurospheres induces a marked increase in generation of DA neurons (Rodriguez-Pallares et al., 2003). The decrease in generation of GABAergic neurons is probably not a major cause of the observed increase in the number of TH-ir neurons in the neurospheres. We have recently shown that treatment of cultures with GABA or simultaneous treatment with GABA_A and GABA_B receptor antagonists did not cause significant changes in generation of DA cells from precursors, while treatment with GABA_A receptor antagonists led to a significant increase in the number of DA cells, and treatment with GABA_B receptor antagonists led to a significant decrease in the number of these cells (Parga et al., 2007).

Interestingly, treatment with cyclopamine did not induce significant changes in the number of serotonergic or TH-ir cells generated from the neurospheres. Cyclopamine selectively inhibits Shh signaling by preventing Smo activation, which was confirmed in the cultures by estimation of Gli-1 mRNA levels with real-time quantitative RT-PCR. Therefore, the results suggest that Shh-induced Smo activation is not significantly involved in the above-mentioned effects and that Shh may exert effects on the mesencephalic precursors that do not involve the canonical Ptc-Smo-Gli signaling cascade. Recently, several authors have also suggested the possibility that some signals triggered by Shh can be Gli-independent, and also Smo- and Ptc-independent (Testaz et al., 2001; Thibert et al., 2003; Riobo and Manning, 2007; Zhang et al., 2007). In neuroepithelial cell cultures, Ptc induces apoptotic cell death unless Shh is present to block the signal, and Ptc-

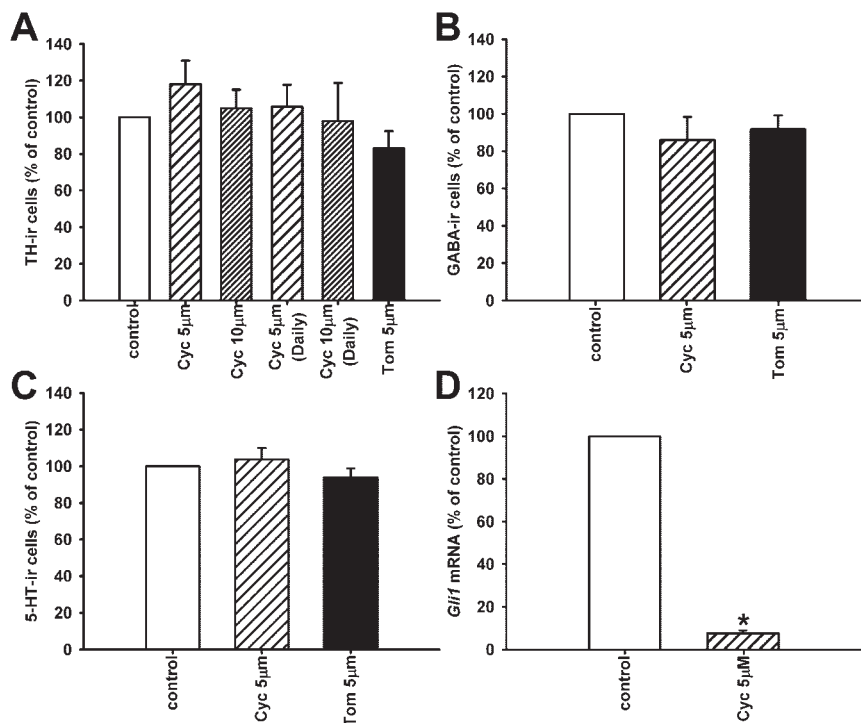


Fig. 5. Effects of treatment with different doses of the hedgehog pathway inhibitor cyclopamine on the number of dopaminergic (TH-ir; **A**), GABAergic (**B**), and serotonergic (5-HT-ir; **C**) cells differentiated from neurospheres of mesencephalic precursors. The generation of TH-ir, GABAergic, and 5-HT-ir cells was not significantly affected by treatment with cyclopamine. Treatment with tomatidine did not induce any significant change. Real time RT-PCR analysis (**D**) confirmed expression of Gli1 mRNA in cultures of mesencephalic precursor cells and revealed a significant decrease in mRNA levels of Gli1 after treatment with cyclopamine (Cyc; 5 μ M). The data are expressed as percentages of the number of TH-, GABA-, or 5-HT-ir cells (A–C) or the relative mRNA expression levels of Gli1 (D) obtained in the respective control cultures (100%). Data represent means \pm SEM. * P < 0.05 vs. control group (i.e., untreated cells). One-way ANOVA (A–C) and Student's t -test (D).

induced cell death is not related to the Ptc-Smo transducing module (Thibert et al., 2003). Although Shh was initially involved in early patterning events in the CNS that are critical to phenotypic specification of DA and serotonergic neurons, it appears that Shh is also involved in later stages of differentiation, survival, and maturation of these neurons, which remain to be clarified, and that the canonical Ptc-Smo-Gli signaling cascade may not be the main cause of all these effects.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Isolation and Culture of Mesencephalic Precursor Cells

Mesencephalic precursor cells were obtained from Sprague-Dawley rat embryos of 12-day gestation (E12). All experiments were carried out in accor-

dance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), and approved by the corresponding committee at the University of Santiago de Compostela. Rats were deeply anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg). Ventral mesencephalic tissue was dissected from the embryos, and incubated in 0.1% trypsin (Sigma, St Louis, MO), 0.05% DNase (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Paisley, UK) for 20 min at 37°C. The tissue was rinsed in DNase/DMEM and mechanically dissociated. The resulting cell suspension was centrifuged at 50g for 5 min, the supernatant was carefully removed, and the pellet resuspended in 0.05% DNase/DMEM to the final volume required. The number of viable cells in the suspension was estimated with acridine orange/ethidium bromide, and cells were plated onto 35-mm culture dishes (BD Falcon, Le Pont de Claix,

France) at a density of 5×10^5 cells/ml. Cells were maintained in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂; 37°C). The proliferation medium was composed of HAMS F12/DMEM (1:3), B27 supplement (1:50; Gibco), and EGF (20 ng/ml; Sigma). After 7 days in vitro, cells formed floating neurospheres (i.e., cell aggregates) that were mechanically dissociated and seeded onto fresh EGF-containing medium, and maintained for another 7 days to purify the long-term-propagating precursor cells and obtain a second generation of cell aggregates. After 2 weeks, neurospheres were gently triturated and plated onto culture dishes previously coated with poly-L-lysine (1 mg/ml; Sigma) in the absence of EGF. Cells from each batch of neurospheres were divided into control cultures (i.e., untreated; group A), and cultures subjected to different treatments at plating (groups B and C). Treatments were added to the medium for an incubation period of 7 days (i.e., 7 days of treatment) and cells were maintained in cultures for 7 days in vitro. Controls (A) and treated (B, C) cultures were processed in the same culture batch as follows. In control cultures (group A), the neurospheres were seeded in a differentiation culture medium composed of HAMS F12/DMEM (1:1) and 10% fetal bovine serum (FBS; Biochrom KG, Berlin, Germany). Group B cells were plated on to the differentiation medium supplemented with anti-Shh protein antibody (1:50–1:200; 5E1, Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB, University of Iowa, IA). In addition, cells treated with a non-relevant hybridoma supernatant (NS1 conditioned medium, kindly provided by the DSHB; 1:50) were used as a negative control for Group-B cultures. NS1 conditioned medium (supernatant) from the NS1 mouse myeloma line contains everything but the anti-Shh protein antibody. Group C cultures were seeded with cyclopamine (5–10 μ M; Sigma) added to the plating medium or daily to the medium from aliquots thawed immediately before use. Cyclopamine is a plant steroidal alkaloid that selectively inhibits Shh signaling by preventing Smo activation. The range of concentrations of cyclopamine was chosen on the basis of the results of previous studies (Gu-

laci and Lillien, 2003; Palma et al., 2005). Cells treated with tomatidine (5 μ M; Sigma) were used as a negative control for group-C cultures. Tomatidine is a steroidal alkaloid structurally similar to cyclopamine but lacks the capacity to inhibit the hedgehog pathway. Finally, real-time quantitative RT-PCR was used to examine the effect of cyclopamine on the expression of the Hedgehog-target gene (see below), as a positive control of the inhibitory effect of cyclopamine on the Patched-Smoothed-Gli signaling pathway in the present experimental conditions.

Immunolabeling

Cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; pH 7.4) for 20 min, and washed three times in DPBS. Cultures were preincubated with a blocking solution containing 10% normal serum in DPBS with 1% bovine serum albumin (DPBS-BSA) and 0.3% Triton X-100 (Sigma) for 1 hr. The cultures were then incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal anti-tyrosine hydroxylase antibody (TH, Sigma; 1:30,000) as a DA marker, or at room temperature with a rabbit polyclonal antiserum against serotonin (Incstar; 1:7,500) as marker of serotonergic cells, a rabbit polyclonal antibody against GABA (Sigma; 1:5,000) as a marker of GABAergic cells, or a mouse monoclonal anti-Shh antibody (1:5; 5E1, Developmental Studies Hybridoma Bank) as a marker of cells containing the Shh protein and a mouse monoclonal anti-FP4 antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank; 1:5) as a marker of floor plate cells. Cultures were then washed and incubated for 1 hr with the corresponding biotinylated secondary antibody diluted 1:500. Cultures were washed then incubated for 90 min with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC, Vector, 1:150). Finally, the labeling was revealed with 0.04% hydrogen peroxide and 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma).

Selected cultures were processed for double immunofluorescence against TH (rabbit polyclonal antiserum, Pel-Freez Biological, Rogers, AK; 1:3,000) or 5-HT or GABA and FP4, or 5-HT and TH. Cultures were incubated

overnight at 4°C with double concentration of the corresponding primary antibodies (see above) containing 1% normal serum and 0.3% Triton X-100 diluted in DPBS-BSA. The cultures were rinsed with DPBS, then incubated for 180 min with the corresponding secondary antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; Chemicon) or cyanine 3.18 (Cy3; Chemicon). To visualize the fluorescent labelling, we used a laser confocal microscope (TCS-SP2; Leica, Heildelberg, Germany), and a sequential scan method to avoid any possible overlap. In all experiments control cultures, in which primary antibody was omitted, were immunonegative for these markers.

Quantification and Data Analysis

Cells were always counted by the same investigator who was unaware of the treatment history, by use of phase contrast or epi-fluorescence microscopy (Nikon's Eclipse inverted microscope, Tokyo, Japan) at $\times 100$ magnification. In each experiment, we counted 15 culture dishes and 15 randomly chosen cell aggregates per dish. A few culture dishes that did not contain at least 15 aggregates were excluded from counting. In each cell aggregate, we estimated the number of DA, serotonergic, or GABA cells by focusing down through the aggregate and counting all immunoreactive cells that came into focus. Thus, $1,590 \pm 274$ TH-ir cells were counted by experiment in a control group. All experiments were replicated at least three times with new groups of EGF-responsive mesencephalic precursor cells. The results were normalized to the counts of the control group of the same batch (i.e., expressed as a percentage of the control-group counts) to counteract any possible variation from one batch to another. All data were expressed as means \pm SEM. Two-group comparisons were analyzed by the Student's *t*-test and multiple comparisons were analyzed with one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. The normality of populations and homogeneity of variances were tested before each ANOVA. Differences at $P < 0.05$ were considered as statistically significant. Statistical

analyses were carried out with SigmaStat 3.0 from Jandel Scientific (San Rafael, CA).

RNA Isolation and Real-Time Quantitative RT-PCR

Total RNA from the cultures of mesencephalic precursor cells was extracted with Trizol (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The concentration of RNA was quantified spectrophotometrically. DNase I (Invitrogen) was used to remove any residual genomic DNA. Total RNA (2 μ g) was reverse-transcribed to cDNA with dNTPs, random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U; Invitrogen). Real-time PCR was used to examine changes in the expression of the Hedgehog-target gene *Gli1* in cultures exposed to cyclopamine. Primers were designed with Beacon Designer Software 5.0 (Biosoft International, Palo Alto, CA) and their specificity was confirmed by Basic Local Alignment Search Tool analysis. β -actin mRNA was used as a control to normalize the amount of RNA sample. Primer sequences were as follows: for *Gli1*, forward 5'-CAGGAAGTCCAT-ATCAGAGC-3', reverse 5'-AAAGC-CAGATCCAAACGTAG-3'; for β -actin, forward 5'-TCGTGCGTGACAT-TAAAGAG-3', reverse 5'-TGCCAC-AGGATTCCATACC-3'. A total of 2 μ l of cDNA was amplified in a final volume of 24 μ l containing 150 nmol/L of each primer and $1 \times$ SYBR Green SuperMix (BioRad, Hercules, CA). PCR thermal cycle parameters were as follows: 95°C for 3 min, 40 cycles of 60°C for 30 s, and 95°C for 1 min, and a melting curve from 65° to 95°C to ensure amplification of a single product. Experiments were performed with a real-time iCycler™ PCR platform (Bio-Rad). The comparative Ct method was used to examine the relative mRNA expression.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pilar Aldrey for her excellent technical assistance.

The antibodies against Shh and FP4 developed by T.M. Jessell and S. Brenner-Morton were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the aus-

pices of the NIC.HD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242, USA.

REFERENCES

- Abeliovich A, Hammond R. 2007. Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev Biol* 304:447–454.
- Alcedo J, Ayzenzon M, Von Ohlen T, Noll M, Hooper JE. 1996. The *Drosophila* smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* 86:221–232.
- Björklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen YCC, McNaught KS, Brownell A, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kwang-Soo K, Isacson O. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2344–2349.
- Charytoniuk D, Porcel B, Rodriguez Gomez J, Faure H, Ruat M, Traiffort E. 2002. Sonic Hedgehog signalling in the developing and adult brain. *J Physiol Paris* 96:9–16.
- Chen MH, Li YJ, Kawakami T, Xu SM, Chuang PT. 2004. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* 18:641–659.
- Chen Y, Struhl G. 1996. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87:553–563.
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM. 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87:661–673.
- Gulacsi A, Lillien L. 2003. Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein regulate interneuron development from dorsal telencephalic progenitors in vitro. *J Neurosci* 23:9862–9872.
- Ho KS, Scott MP. 2002. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 12:57–63.
- Hynes M, Rosenthal A. 1999. Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr Opin Neurobiol* 9:26–36.
- Hynes M, Porter JA, Chiang C, Chang D, Tessier-Lavigne M, Beachy PA, Rosenthal A. 1995a. Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic Hedgehog. *Neuron* 80:95–101.
- Hynes M, Poulsen K, Tessier-Lavigne M, Rosenthal A. 1995b. Control of neuronal diversity by the floor plate: contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell* 80:95–101.
- Hynes M, Stone DM, Dowd M, Pitts-Meek S, Goddard A, Gurney A, Rosenthal A. 1997. Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron* 19:15–26.
- Hynes M, Ye W, Wang K, Stone D, Murone M, Sauvage F, Rosenthal A. 2000. The seven-transmembrane receptor smoothened cell-autonomously induces multiple ventral cell types. *Nat Neurosci* 3:41–46.
- Iacovitti L, Donaldson AE, Marshall CE, Suon S, Yang M. 2007. A protocol for the differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons using only chemically defined human additives: Studies in vitro and in vivo. *Brain Res* 1127:19–25.
- Kim J-Y, Koh HC, Lee J-Y, Chang M-Y, Kim YC, Chung H-Y, Son H, Lee Y-S, Studer L, McKay R, Lee S-H. 2003. Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* 85:1443–1454.
- Lee S-H, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18:675–679.
- Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM. 1998. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol* 149:411–423.
- Marti E, Bovolenta P. 2002. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* 25:89–96.
- Miao N, Wang M, Ott JA, D'Alessandro JS, Woolf TM, Bumcrot DA, Mahanthappa NK, Pang K. 1997. Sonic hedgehog promotes the survival of specific CNS neuron populations and protects these cells from toxic insult in vitro. *J Neurosci* 17:5891–5899.
- Ostenfeld T, Horn P, Aardal C, Orpen I, Caldwell MA, Svendsen CN. 1999. Mouse epidermal growth factor-responsive neural precursor cells increase the survival and functional capacity of embryonic rat dopamine neurons in vitro. *NeuroReport* 10:1985–1992.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A. 2005. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132:335–344.
- Parga J, Rodriguez-Pallares J, Munoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2006. Serotonin decreases generation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via serotonin type 7 and type 4 receptors. *J Neurobiol* 67:10–22.
- Parga JA, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2007. Effects of GABA and GABA receptor inhibition on differentiation of mesencephalic precursors into dopaminergic neurons in vitro. *J Neurobiol Dev Neurobiol* 67:1549–1559.
- Placzek M, Briscoe J. 2005. The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* 6:230–240.
- Placzek M, Jessell M, Dodd J. 1993. Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. *Development* 117:205–218.
- Potter ED, Ling ZD, Carvey PM. 1999. Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons. *Cell Tissue Res* 296:235–246.
- Rafuse VF, Soundararajan P, Leopold C, Robertson HA. 2005. Neuroprotective properties of cultured neural progenitor cells are associated with the production of sonic hedgehog. *Neuroscience* 131:899–916.
- Riaz SS, Bradford HF. 2005. Factors involved in the determination of the neurotransmitter phenotype of developing neurons of the CNS: applications in cell replacement treatment for Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 76:257–278.
- Riobo NA, Manning DR. 2007. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem J* 403:369–379.
- Rodriguez-Pallares J, Rey P, Soto-Otero R, Labandeira-Garcia JL. 2001. N-Acetylcysteine enhances production of dopaminergic neurons from mesencephalic-derived precursor cells. *NeuroReport* 12:3935–3938.
- Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2003. Elimination of serotonergic cells induces a marked increase in generation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors. *Eur J Neurosci* 18:2166–2174.
- Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2004. Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci* 20:1489–1498.
- Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2005a. Angiotensin II and interleukin-1 interact to increase generation of dopaminergic neurons from neurospheres of mesencephalic precursors. *Brain Res Dev Brain Res* 158:120–122.
- Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2005b. Expanded mesencephalic precursors treated with antibodies against FGF4 to increase dopaminergic differentiation survive and induce recovery after transplantation in a parkinsonian rat model. *Synapse* 58:13–22.
- Ruiz i Altaba A. 1998. Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* 125:2203–2212.
- Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, Gage FH. 1999. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 126:4017–4026.
- Studer L, Tabar V, McKay RD. 1998. Transplantation of expanded precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* 1:290–295.
- Studer L, Csete M, Sang-Hun L, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R. 2000. Enhanced proliferation, survival and dopaminergic differentiation of CNS pre-

- cursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 20:7377–7383.
- Stull ND, Iacovitti L. 2001. Sonic hedgehog and FGF8: inadequate signals for the differentiation of a dopamine phenotype in mouse and human neurons in culture. *Exp Neurol* 169:36–43.
- Svendsen CN, Caldwell MA, Ostenfeld T. 1999. Human neural stem cells: Isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol* 9:499–513.
- Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M, Hayashi H, Imazato T, Kawasaki H, Sue-mori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N, Sasai Y, Hashimoto N. 2005. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest* 115:102–109.
- Testaz S, Jarov A, Williams KP, Ling LE, Koteliensky VE, Fournier-Thibault C, Duband JL. 2001. Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the Patched- Smoothened-Gli signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12521–12526.
- Thibert C, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM, Mehlen P. 2003. Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* 301:843–846.
- Wagner J, Akerud P, Castro DS, Holm PC, Canals JM, Snyder EY, Perlmann T, Arenas E. 1999. Induction of a mid-brain dopaminergic phenotype in *Nurr1*-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* 17:653–659.
- Wallace VA. 1999. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 9:445–448.
- Wang MZ, Jin P, Bumcrot DA, Marigo V, McMahon AP, Wang EA, Woolf T, Pang K. 1995. Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by Sonic hedgehog protein. *Nat Med* 1:1184–1188.
- Ye W, Shimamura K, Rubenstein JLR, Hynes MA, Rosenthal A. 1998. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93:755–766.
- Zhang J, Lipinski R, Shaw A, Gipp J, Bushman W. 2007. Lack of demonstrable autocrine hedgehog signaling in human prostate cancer cell lines. *J Urol* 177:1179–1185.

4.5- Precursores mesencefálicos proliferados in vitro forman implantes de neuronas dopaminérgicas densamente agrupadas que reinervan el estriado circundante e inducen respuestas funcionales en las neuronas estriatales.

Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2005) Expanded mesencephalic precursors develop into grafts of densely packed dopaminergic neurons that reinnervate the surrounding striatum and induce functional responses in the striatal neurons. *Synapse* 58:13-22.

Una de las terapias experimentales más prometedoras para la EP es el trasplante de células dopaminérgicas. Clínicamente se ha hecho uso de tejido procedente del mesencéfalo fetal. Sus células sobreviven una vez implantadas y dan lugar a neuronas capaces de sintetizar DA y formar conexiones con las células vecinas, siendo capaces de mejorar síntomas motores en pacientes de EP. Esta capacidad ha impulsado el desarrollo de numerosos protocolos para la obtención in vitro de células productoras de DA destinadas al trasplante. Sin embargo hay todavía muchas dificultades éticas y técnicas concernientes a esta aproximación e incluso el uso de tejido fetal tiene serias limitaciones y genera dudas sobre su efectividad.

En el presente estudio comparamos ratas normales con ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA (como modelo animal de la EP). Las ratas lesionadas recibieron en el estriado denervado o bien un trasplante con neuroesferas de precursores mesencefálicos proliferados in vitro, o bien un implante con células procedentes del mesencéfalo ventral, o bien se les inyectó salino en lugar de una suspensión celular. Se evaluó la lesión, el grado de recuperación de los animales tras el trasplante y las características morfológicas del implante y del estriado hospedador.

Mientras que las ratas normales no tuvieron un comportamiento rotacional asimétrico en respuesta a la anfetamina, las que fueron lesionadas con 6-OHDA presentan una asimetría muy acusada rotando hacia el lado lesionado. Esta asimetría se lograba reducir en las ratas que recibieron implantes celulares, pero no en el grupo que recibió salino. En este grupo la expresión de Fos inducida por anfetamina y los terminales DAérgicos del estriado denervado estaban prácticamente ausentes, y el número de neuronas TH-ir de la SN ipsilateral se vio reducido.

Los implantes de precursores mesencefálicos mostraron que las células eran capaces de sobrevivir al menos durante 3 meses. Además inducían la expresión de Fos en las células estriatales del animal huésped en respuesta a anfetamina. El número de células TH-ir en los implantes que lograron reducir la rotación ipsilateral del animal en respuesta a la inyección de anfetamina era ligeramente menor al de los implantes de tejido fetal. Asimismo, el volumen y el área de inervación era menor en los implantes procedentes de precursores mesencefálicos, pero carecían del área central no TH-ir que se suele hallar en implantes de tejido fetal y presentaban una mayor concentración de células TH-ir y menos 5-HT-ir.

Expanded Mesencephalic Precursors Develop Into Grafts of Densely Packed Dopaminergic Neurons That Reinnervate the Surrounding Striatum and Induce Functional Responses in the Striatal Neurons

J. RODRIGUEZ-PALLARES, J.A. PARGA, P. REY, M.J. GUERRA, AND J.L. LABANDEIRA-GARCIA*

Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology, Department of Morphological Sciences, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

KEY WORDS dopamine; fibroblast growth factor 4; Fos; progenitors; Parkinson's disease; transplantation

ABSTRACT The search for alternative sources of dopaminergic cells, other than primary fetal tissue for transplantation in Parkinson's disease has become a major focus of research. Different methodological approaches have led to generation in vitro of cells expressing DA-cell markers, although these cells are frequently unable to survive for a long time in vivo after transplantation and/or induce functional effects in the host brain. In the present study, we grafted cell aggregates treated with antibodies against fibroblast growth factor 4 into dopaminergic-denervated striata in rats. Furthermore, we grafted cell suspensions from primary mesencephalic fetal tissue. Grafts from expanded precursors were able to survive (at least 3 months postgrafting) and most decreased the lesion-induced ipsiversive rotation. In addition, immunolabeling for tyrosine hydroxylase and/or Fos showed that the grafts reinnervated the surrounding striatal tissue with dopaminergic terminals, and induced the expression of Fos in the striatal neurons of the reinnervated area after administration of amphetamine to the host rat. The number of dopaminergic cells in grafts from expanded precursors inducing rotational recovery was usually lower ($1,226 \pm 314$) than that in grafts from primary fetal tissue ($1,671 \pm 122$), but they were more densely packed in grafts that were of smaller volume and did not have the characteristic central nondopaminergic area observed in grafts from primary fetal tissue. The results suggest that long-term survival and functional integration into the DA-denervated striatum can be achieved with grafts of expanded mesencephalic precursors. **Synapse 58:12–21, 2005.** © 2005 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Parkinson's disease is a degenerative disorder characterized by a loss of midbrain dopamine (DA) neurons and a subsequent reduction in striatal DA innervation. Pharmacological treatments work for a limited period, after which alternative treatments are necessary. Transplantation of new DA cells is one of the most promising approaches; however, the use of neural grafts is severely limited by technical and ethical problems associated with the use of primary fetal tissue (Dunnett et al., 2001; Lindvall and Hagell, 2000). The search for alternative sources of DA neurons has become a major focus of research. There are advan-

tages and disadvantages associated with the generation of DA neurons from embryonic stem cells, multipotent stem cells, or neural progenitor cells (Arenas, 2002; Björklund et al., 2002; Lindvall, 2003; Roybon et al., 2004). Different methodological approaches have led to the generation in vitro of cells expressing

*Correspondence to: Jose L. Labandeira-Garcia, M.D., Ph.D., Dept. of Morphological Sciences, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain. E-mail: cmlaband@usc.es

Contract grant sponsor: Spanish MCYT and XUGA.

Received 15 October 2004; Accepted 31 March 2005

DOI 10.1002/syn.20179

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DA-cell markers, although these cells are frequently unable to survive for a long time in vivo after transplantation and/or induce functional effects in the host brain, and successful in vivo grafting data is currently still limited to precursor cells isolated from ventral midbrain (Arenas, 2002; Kim et al., 2003). Cell aggregates of expanded mesencephalic precursors spontaneously convert to neurons and glia following mitogen withdrawal, but rarely express the DA neuron phenotype. Accordingly, transplantation of these untreated aggregates leads to very poor results (i.e., no or just a few surviving DA neurons). Several in vitro treatments induced increase in generation of DA neurons from precursors and survival of grafted DA neurons. However, it is considered that, after transplantation, these DA cells are less mature and integrate less well with the host brain than primary fetal tissue does (Kim et al., 2003; Ostenfeld et al., 2002; Roybon et al., 2004; Svendsen et al., 1996). There are few reports of DA cells generated in vitro from mesencephalic precursors (Sanchez-Pernaute et al., 2001; Studer et al., 1998) or derived from embryonic stem cells (Björklund et al., 2002; Kim et al., 2002) that remain effective in vivo after transplantation. Graft function has usually been studied by testing the rotational behavior in hemiparkinsonian rodents. However, there are no histological evidences of graft-induced responses in the host striatal neurons.

We have recently shown that treatment of cell aggregates obtained from rat mesencephalic precursors with an antibody against fibroblast growth factor 4 (FGF4) induces a marked decrease in the generation of serotonin (5-HT) neurons and a marked increase in generation of DA neurons (Rodriguez-Pallares et al., 2003). In the present study, therefore, we treated the mesencephalic precursors with antibodies against FGF4. However, it is not known if these DA neurons are able to survive after transplantation in DA-denervated striata, innervate the host striatum, and induce functional effects. Successful grafting could be expected if treatment with antibodies against FGF4 only induces a fate switching effect, but probably not if the treatment induces major modification of the precursor-derived DA neuronal functions.

Activation of the immediate-early gene *c-Fos*, and the consequent expression of the Fos nuclear protein, is induced by a variety of stimuli that provoke changes in striatal neuronal function and second messenger activity. Fos expression is considered to be a link between transient extracellular signaling events and longer-term changes in genomic activity (Dragunow and Faull, 1989; Morgan and Curran, 1991; Sagar et al., 1988). It is well known that DA-releasing drugs and DA agonists induce Fos in striatal neurons (Graybiel et al., 1990; Robertson et al., 1992) and that, in unilaterally DA-denervated rats grafted with primary mesencephalic fetal tissue, amphetamine induces DA release from the graft-derived terminals, followed by the subsequent expression of Fos in the striatal neurons reinnervated by the graft (Cenci et al., 1992; Lopez-Martin et al., 1999a).

In the present study, we grafted cell aggregates obtained from expanded mesencephalic precursors treated with antibodies against FGF4, into DA denervated striata (i.e., a rat model of parkinsonism), and we studied their in vivo survival and functional effects. Furthermore, we also studied grafts from primary fetal tissue obtained from the same mesencephalic region and implanted following the same procedure. Functional effects were studied by testing amphetamine-induced rotational behavior and Fos expression in host striatal cells.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

A total of 21 adult female Sprague-Dawley rats (Leticia, Barcelona, Spain), each weighing about 200 g at the beginning of the experiment, were used. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). Most of the rats were subjected to maximal unilateral DA denervation with 6-hydroxydopamine (6-OHDA), and some untreated rats ($n = 3$) were used as normal controls. One month after 6-OHDA injection, those rats showing maximal lesions in the rotometer, after injection of apomorphine (0.05 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in 0.02% ascorbate saline and injected subcutaneously in the neck, were selected ($n = 18$); 1 week later, these rats were tested again in the rotometer after one injection of amphetamine (Sigma; 5 mg/kg in saline, i.p.), and 1 week later, they were divided into three experimental groups. Rats in group A ($n = 4$) were sham-grafted with saline. Rats in group B ($n = 6$) were grafted with a cell suspension from fetal ventral mesencephalon. Rats in group C ($n = 8$) were grafted with cell aggregates containing DA neurons obtained from expanded mesencephalic precursors. Three months after grafting, the rats received a second injection of amphetamine and were again tested in the rotometer, then killed 2 h after the injection for histological study.

Abbreviations

5-HT	serotonin
6-OHDA	6-hydroxy dopamine
AADC	aromatic L-amino-acid decarboxylase
DA	dopamine
DAT	dopamine transporter
EGF	epidermal growth factor
FGF4	fibroblast growth factor 4
g	graft
ir	immunoreactivity
shh	sonic hedgehog
TH	tyrosine hydroxylase

6-Hydroxydopamine lesion

The surgery was performed under ketamine/xylazine anesthesia. Unilateral lesions of the DA system were performed by injecting 12 μ g of 6-OHDA HBr (Sigma) in 4 μ l of sterile saline containing 0.2% ascorbic acid into the right medial forebrain bundle. The stereotaxic coordinates were 3.7 mm posterior to bregma, -1.6 mm lateral to midline, 8.8 mm ventral to the skull at the midline, in the flat skull position. (Paxinos and Watson, 1986). The solution was injected using a 5- μ l Hamilton syringe coupled to a motorized injector (Stoelting, IL, USA) at 0.1 μ l/min, and the canula was left in situ for 2 min after injection. Thirty minutes prior to surgery, rats received desipramine (Sigma; 25 mg/kg, i.p.) to prevent uptake of 6-OHDA by noradrenergic terminals. The efficacy of the lesion was evaluated using a rotometer (see later): rats showing more than 200 net contraversive turns per hour after injection of 0.05 mg/kg of apomorphine (i.e., maximally lesioned rats; see Hudson et al., 1993) were used, and the lesion confirmed by subsequent immunohistochemistry (see below).

Preparation of DA cells and transplantation surgery

Group-B rats (i.e., rats transplanted with primary fetal tissue) received intrastriatal injections of cell suspensions prepared from fetal (13–14 days of gestation) ventral mesencephalon. The donor rats were deeply anesthetized with chloral hydrate. The pieces of ventral mesencephalon were dissected out and incubated in 0.1% trypsin (Sigma), 0.05% DNase (Sigma), and DMEM (Gibco, Paisley, UK) for 20 min at 37°C. The tissue was then rinsed in DNase/DMEM and mechanically dissociated to produce a milky cell suspension. This cell suspension was centrifuged at 600 rpm for 5 min and the supernatant was carefully removed and resuspended in 0.05% DNase/DMEM to the final volume required. A sample of the cell suspension was taken before each grafting session and transferred to a hemocytometer to assess cell concentration and viability. The cell concentration was 100,000–150,000 cells/ μ l, and the cell viability prior to transplantation was 90–95% (estimated by acridine orange/ethidium bromide).

Group-C rats were grafted with cells from expanded mesencephalic precursors. Mesencephalic precursors were obtained from cell suspensions prepared as mentioned earlier. The number of viable cells in the suspension was estimated using acridine orange/ethidium bromide, and cells were plated onto 35-mm culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) at a density of 10^6 cells/2 ml. Cells were maintained in a humidified CO₂ incubator (5% CO₂; 37°C). The proliferation medium was made up of HAMS F12/DMEM (1:3), B27 supplement (1:50; Gibco), and epidermal growth

factor (EGF) (20 ng/ml; Sigma). After 7 days in vitro, cells formed floating clusters (i.e., cell aggregates) that were mechanically dissociated and seeded onto fresh EGF-containing medium, and maintained for another 7 days to purify the long-term propagating precursor cells and obtain a second generation of cell aggregates. After 2 weeks, cell aggregates were seeded during 2 days in a differentiation culture medium composed of HAMS F12/DMEM (1:1) and 10% fetal bovine serum (FBS; Biochrom KG, Berlin, Germany) in the absence of EGF, and supplemented with a monoclonal antifibroblast growth factor 4 neutralizing antibody (FGF-4, 20 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). For further details of the procedure see Rodriguez-Pallares et al. (2003). The cell aggregates were then collected by centrifugation at 600 rpm for 5 min, and dissociated and resuspended in the same medium to give the final volume required (100,000–150,000 cells/ μ l). A sample of the cell suspension was taken to assess cell concentration and viability as described above.

Six microliters of differentiation culture medium containing anti-FGF4 antibodies and cell aggregates from mesencephalic precursors (group-C rats), or 6 μ l of cell suspension from primary fetal tissue (group-B rats) were administered to each rat, using a Hamilton syringe at three injection sites ($\sim 3 \times 2$ μ l): (I) A = 1.8, L = -2.2 , V = 4.5; (II) A = 0.6, L = -2.0 , V = 4.5; (III) A = 0.6, L = -3.2 , V = 4.5.

Behavioral testing

Drug-induced rotation was tested in a bank of eight automated rotometer bowls (Rota-count 8, Columbus Instruments, USA), which monitor full (360°) body turns in either direction. For each rat, the net rotation asymmetry score was calculated by subtracting the total number of full turns to the left (i.e., contralateral to the lesion) from the total number of full turns to the right (i.e., ipsilateral to the lesion) over the test period. The rats were acclimatized to the Rota-count for at least 15 min before drug treatment, and turning behavior was monitored for 90 min after the injection of D-amphetamine or for 60 min after the injection of apomorphine. The results are presented as means \pm SEM, and statistical differences were tested using ANOVA followed by post hoc Tukey tests ($P < 0.05$).

Immunolabeling

After the turning session (2 h after the amphetamine injection), the animals were killed by chloral hydrate overdose and then perfused first with 0.9% saline and then with cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The brains were removed and subsequently washed and cryoprotected in the same buffer containing 20% sucrose, and finally cut

into 40- μ m sections (i.e., three series of sections through the striatum of each rat) on a freezing microtome.

Series of free-floating sections were processed for tyrosine hydroxylase (TH), or 5-HT, or dopamine transporter (DAT), or aromatic L-amino-acid decarboxylase (AADC), or Fos immunohistochemistry as follows. Sections were preincubated for 1 h in a blocking solution containing 10% normal serum, with 0.25% Triton X-100 in 0.02 M potassium phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin (KPBS-BSA). The sections were then incubated overnight at room temperature with the corresponding primary antibody: a mouse monoclonal antibody to TH (1:10,000 in KPBS-BSA containing 2% normal horse serum and 0.25% Triton X-100; Sigma), or a rabbit polyclonal antiserum to DAT (1:100 in KPBS-BSA containing 2% normal swine serum and 0.25% Triton X-100; Chemicon, Temecula, CA, USA), or a rabbit polyclonal antiserum to AADC (1:1,000 in KPBS-BSA containing 2% normal swine serum and 0.25% Triton X-100, Affiniti Research Products, Exeter, UK), or a rabbit polyclonal antiserum to 5-HT (1:1,500 in KPBS-BSA containing 2% normal swine serum and 0.25% Triton X-100; Incstar, Stillwater, MN, USA), or a sheep polyclonal anti-Fos antiserum directed against the N'-terminal region of the c-Fos protein molecule (1:1,000 in KPBS-BSA containing 1% normal rabbit serum, 0.25% Triton X-100 and 0.1% sodium azide; antiserum OA-11-824A; Genosys Biotechnologies, Cambridge, UK). The sections were subsequently incubated, first for 60 min with the corresponding biotinylated secondary antibody (Vector, Burlingame, CA, USA; diluted 1:200) and then for 90 min with an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC, Vector, diluted 1:100 in KPBS, containing 0.25% Triton X-100 for Fos). Finally, the labeling was visualized by treatment with 0.04% hydrogen peroxide and 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma).

Representative sections containing the transplants were processed for double immunofluorescence against TH and DAT or AADC. The sections were incubated for 48 h at 4°C with the corresponding primary antibodies (mouse monoclonal anti-TH, 1:5,000; and rabbit polyclonal anti-DAT, 1:50; or rabbit polyclonal anti-AADC, 1:500) containing 1% normal serum and 0.3% Triton X-100 diluted in KPBS-BSA. After rinsing with KPBS, the sections were incubated for 150 min with the corresponding secondary antibodies: goat antirabbit conjugated with cyanine 3.18 (Cy3, 1:500; Chemicon), and goat antimouse conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC, 1:100; Chemicon). Sections were visualized by a Nikon Optiphot microscope coupled to an epifluorescence system (Nikon, Tokyo, Japan), and colocalization of markers was confirmed by means of a laser confocal microscope (TCS-SP2; Leica, Heidelberg, Germany).

Other sections were processed for double immunolabeling of TH and Fos. Briefly, protein Fos was immunolabeled as described earlier, but using DAB-nickel sulfate to develop the reaction so that the precipitated product was black. The sections were then incubated for 48 h at 4°C with a mouse anti-TH antibody. After rinsing, tissue was incubated for 150 min with the secondary antibody (goat antimouse; Sigma) diluted 1:50, and then for another 150 min with peroxidase-antiperoxidase (PAP) antimouse (1:100; Sigma). The immunostaining was carried out in DAB without nickel sulfate as a chromogen to obtain a brown precipitate. In all cases, control sections processed without primary antibodies showed a lack of immunolabeling.

Quantification procedures

Counting of TH or 5-HT positive neurons was carried out in every third section covering the entire graft from the rostral tip to the caudal end. Sampling was done using the CAST-Grid system (Computer Assisted Stereological Toolbox; Olympus, Denmark), which is composed of an Olympus IX51 microscope, a ProScan II X-Y motorized stage (Prior Scientific, UK) run by a PC computer, a microcator (MT1201; Heidenhain, Germany) connected to the stage and that feeds the computer with the distance information in the Z-axis, and a JVC color video camera (Japan). The CAST-Grid software (version 2.1.5.9) was used to delineate the graft (i.e., the areas of each section containing grafted cells) as observed with a 4 \times objective, and to generate counting areas. A counting frame (1,800 μ m²) was placed at random on the first counting area and systematically moved through all counting areas until the entire delineated area was sampled. The sampling frequency was chosen so that a minimum of 100 TH-positive neurons were counted in each rat. In small grafts (i.e., group C2, see Results), all the TH-positive neurons in the delineated area were counted (i.e., sampling fraction = 100%). Counting was done using a 100 \times oil objective (nora-drenaline (NA) 1.4). Guard volumes (5 μ m from the top and the bottom of the section) were excluded from both surfaces to avoid the problem of lost caps, and only the profiles that came into focus within the counting volume (with a depth of 12 μ m) were counted. The total number of neurons was calculated according to the optical fractionator formula (West et al., 1991). The coefficient of error associated with the estimation was calculated according to Gundersen and Jensen (1987) and was less than 0.10. The graft volume was estimated according to Cavalieri's method (Gundersen et al., 1988).

The density of Fos immunoreactive nuclei and the striatal area reinnervated by the grafts were measured with the aid of NIH-Image 1.55 image analysis

software (Wayne Rasband, MIMH) on a Macintosh personal computer coupled to a videocamera connected to a microscope. Fos-positive nuclei were counted with a 20 \times Nikon Apo-plan objective in striatal sections containing the grafts and processed for Fos immunohistochemistry (or double TH/Fos immunohistochemistry in rats in which some sections were immunoreacted for DAT or AADC). The thresholding options of the image analysis program (size of the particle and optical density) were set so that only cells with unequivocally positive nuclei were counted, and the background was ignored. The area to be analyzed was then encircled, and the Fos-positive nuclei counted automatically to obtain the number of nuclei/mm², as well as the area of the reinnervated striatum. Statistical differences were tested using one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test ($P < 0.05$). Normality of populations and homogeneity of variances were tested before each ANOVA. All statistical analyses were performed using Sigmasat 3.0 from Jandel Scientific (San Diego, CA, USA).

RESULTS

Normal rats and rats with DA denervation and sham grafts

Normal (i.e., nonlesioned) rats showed no significant rotational asymmetry after amphetamine injection. Immunohistochemical analysis revealed intense striatal TH-immunoreactivity (TH-ir), and serotonergic (5-HT) terminals densely innervating both striata. Injection of amphetamine induced intense striatal expression of Fos. The Fos-ir nuclei were not homogeneously distributed. In the caudal striatum most of the nuclei were located dorsally, and in the central and rostral striatum Fos-ir were most densely concentrated in the medial striatal region. (Figs. 1A and 1C). See Labandeira-Garcia et al. (1994) and Lopez-Martin et al. (1999a) for further details.

In the rats subjected to maximal DA denervation with 6-OHDA, evaluation of amphetamine-induced rotational behavior revealed intense rotation towards the denervated side. No significant decrease in rotational behavior was observed in rats sham-grafted with saline (Fig. 2). TH-ir was practically absent from the DA-denervated striatum (Fig. 1B), and there was loss of TH-ir neurons in the ipsilateral substantia nigra. The Fos immunohistochemistry revealed negligible amphetamine-induced Fos expression in the DA-denervated striatum (Fig. 1D).

Rats with DA denervation and grafts from primary fetal tissue

In the rats subjected to DA denervation and fetal grafting, evaluation of the amphetamine-induced rotational behavior 3 months after grafting revealed that the intense ipsiversive rotation observed after

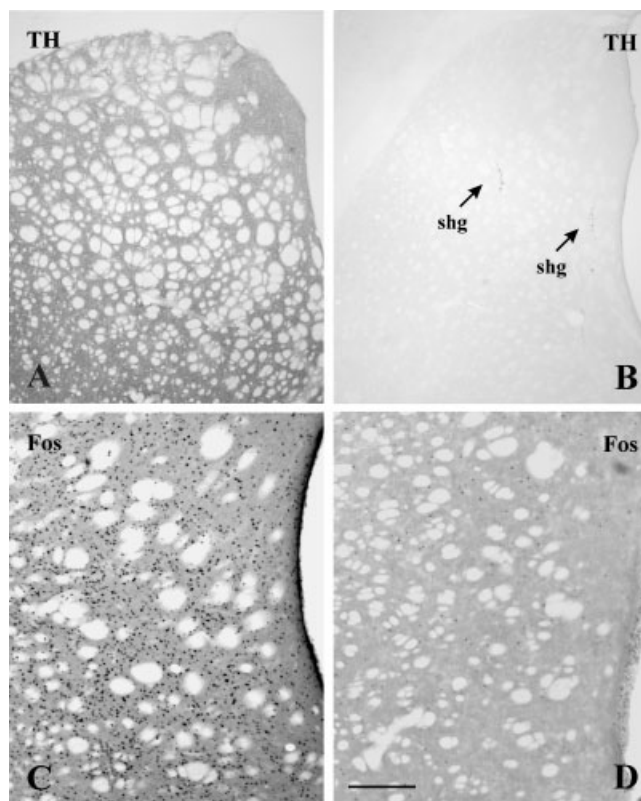


Fig. 1. TH immunoreactivity (A, B) or amphetamine-induced Fos expression (C, D) in a normal rat (A, C), and in a rat subjected to unilateral dopaminergic denervation and sham grafting (shg; B, D). The immunoreactivity for TH has disappeared (B) and there is no significant Fos expression (D) in the denervated striatum. Scale bar = 200 μ m.

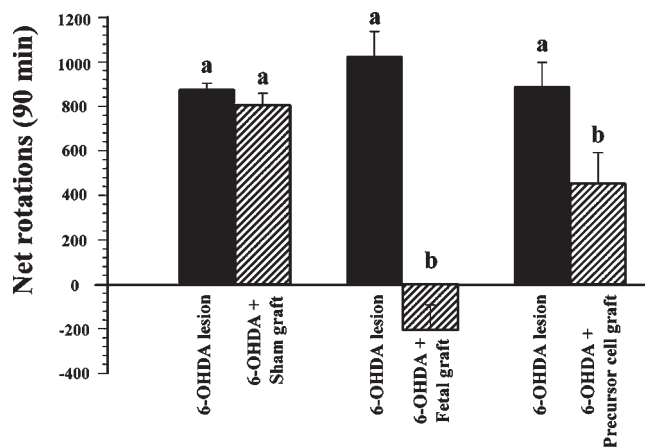


Fig. 2. Turning behavior induced by amphetamine (i.e., rotation scores over the 90-min session) in rats subjected to unilateral dopaminergic denervation (i.e., before cell grafting; black) and after sham grafting (gray, group-A rats; $n = 4$), after grafting with primary fetal tissue (gray, group-B rats; $n = 6$), and after grafting with aggregates from expanded mesencephalic precursors (gray, group-C rats; $n = 8$). Data represent means \pm SEM. Means from nongrafted rats (a) differ significantly from means from grafted rats (b). $P < 0.05$, one-way ANOVA and post hoc Tukey tests.

the 6-OHDA lesion changed (a decrease of $\sim 120\%$) into contraversive rotation (i.e., towards the non-denervated striatum) after grafting (Fig. 2). There were

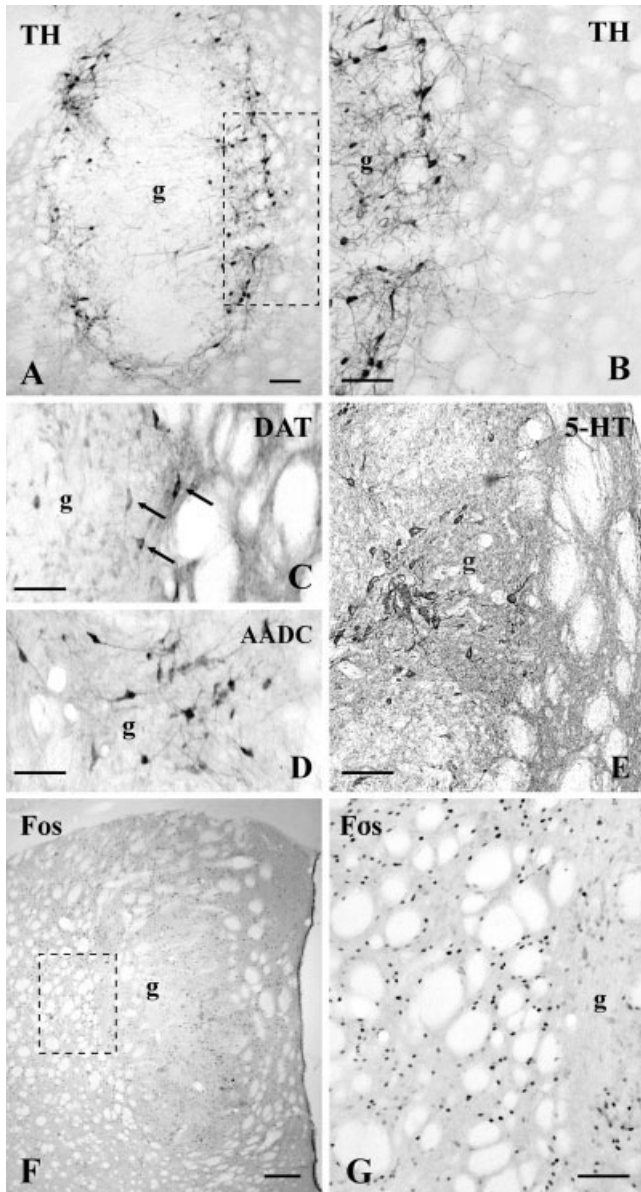


Fig. 3. Photomicrographs showing immunoreactivity (ir) against TH (A, magnified in B), DAT (C), AADC (D), 5-HT (E), or amphetamine-induced Fos expression (F, magnified in G) in rats subjected to unilateral dopaminergic denervation and grafting with primary fetal tissue. Numerous TH-ir neurons are located in the periphery of the graft (g; A), and TH-ir fibers innervate the striatal area surrounding the graft (i.e., the reinnervation area; B). These neurons were immunoreactive for DAT (C) and AADC (D). In addition, numerous 5-HT-ir neurons were also located within the grafts (E). Administration of amphetamine to the host rat induced intense Fos expression in the reinnervation area (F, G). Scale bar = 100 μ m.

numerous TH-ir neurons within each graft ($1,671 \pm 122$) and a TH-ir area (i.e., reinnervation area; 2.15 ± 0.17 mm²) surrounding the graft (Figs. 3A and 3B, and 4A and 4B). TH-ir neurons were not evenly distributed within the graft, but were usually grouped in patches located in the periphery of the graft, whereas the central area of the grafts was usually TH-negative. The density of TH-ir cells ($1,289 \pm 129$ per mm³)

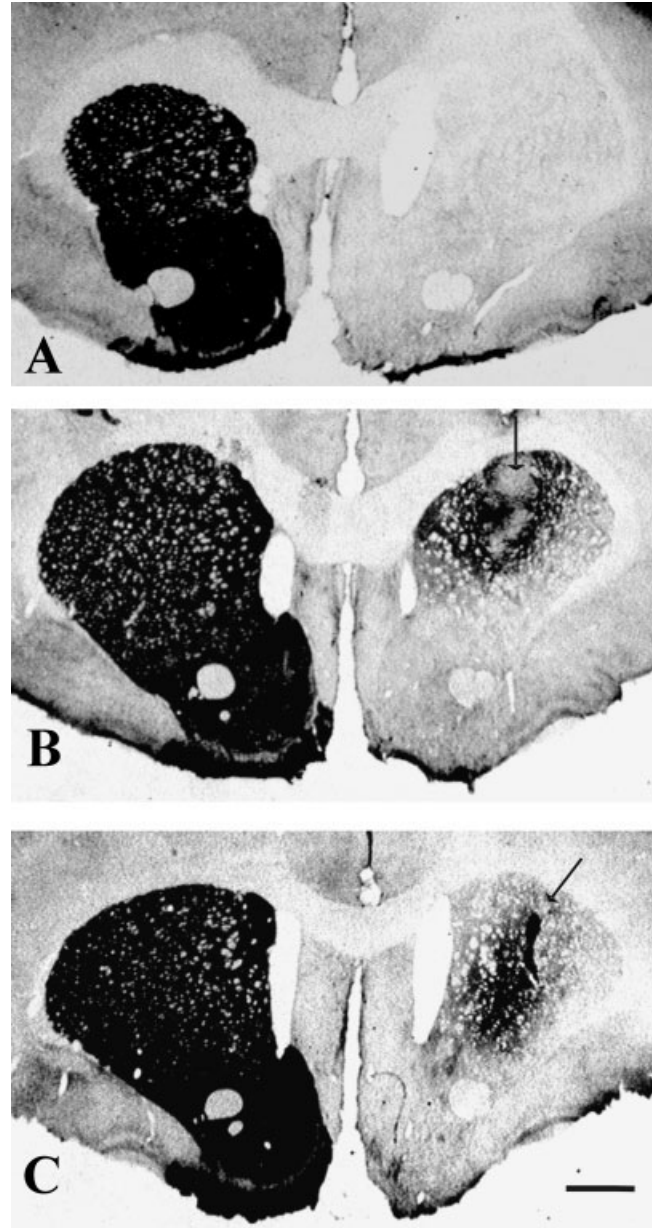


Fig. 4. Photomicrographs showing immunoreactivity (ir) against TH in rats subjected to unilateral dopaminergic denervation and then sham grafting (A), grafting with primary fetal tissue (B), or grafting with in vitro expanded mesencephalic precursors (C). There is intense TH-ir in the nonlesioned striatum and in the reinnervation area in B and C. The central TH-negative area located in grafts (arrows) from primary fetal tissue (B) is not observed in C. Scale bar = 1 mm.

was, therefore, relatively low with respect to the volume of the grafts (1.31 ± 0.07 mm³). TH-ir neurons were also positive for other DA markers such as DAT and AADC (Figs. 3C and 3D). In addition, a considerable number of 5-HT-ir neurons were observed within the grafts (Fig. 3E). In the present experiments the ratio of TH-ir cells to 5-HT-ir cells was around 1:0.6. The Fos immunohistochemistry revealed intense amphetamine-induced expression of Fos in the area surrounding each graft (i.e., the reinnervation area;

393 ± 29 nuclei/mm²), while non-reinnervated areas showed no Fos immunoreactivity (Figs. 3F and 3G).

Rats with DA denervation and grafts from in vitro expanded mesencephalic precursors

In vivo analysis of amphetamine-induced rotational behavior in group-C rats 3 months after grafting revealed a significant decrease in the lesion-induced ipsiversive rotation ($P < 0.05$; Fig. 2). However, unlike group-A and group-B rats, which showed a homogeneous response, two different types of behavior were observed in group-C rats. In one subgroup of five rats (C1), there was a marked decrease in the lesion-induced ipsiversive rotation (944 ± 177 turns pregrafting and 213 ± 99 turns postgrafting). One of these rats showed contraversive rotation (130% decrease). The other three rats (subgroup C2) did not show any significant decrease in the lesion-induced rotation (791 ± 41 turns pregrafting and 848 ± 152 turns postgrafting).

Immunohistochemical analysis of the grafted animals revealed that all animals showed intrastriatal grafts of TH-ir neurons. The animals with significant reduction in their ipsiversive rotation (subgroup C1) had grafts with a considerable number of TH-ir neurons ($1,226 \pm 314$; Figs. 5A and 5G), and the graft in the animal that showed contraversive rotation had a total of 2,187 TH-ir neurons. The grafts in rats with no significant reduction in lesion-induced rotation (subgroup C2) contained a low number of TH-ir neurons (188 ± 46). The average graft volume and surrounding reinnervation area (0.17 ± 0.04 mm³ and 0.67 ± 0.04 mm², respectively, in rats with significant rotational recovery) were considerably smaller than those observed in grafts from primary fetal tissue (Figs. 4B and 4C), but TH-ir neurons were more densely packed ($6,975 \pm 724$ cells/mm³), and a large number of TH-ir fibers innervated the striatal area surrounding the grafts (Figs. 5A and 5G). The central TH-negative area usually located in grafts from primary fetal tissue was not observed in group-C grafts. Serotonin immunohistochemistry revealed that some 5-HT-ir cells were still present in the grafts (Fig. 5B). In rats with grafts inducing rotational recovery, the ratio of TH-ir to 5-HT-ir was around 5:1, and in grafts with a reduced number of TH-ir neurons the ratio decreased to around 2:1. Double labeling studies revealed that grafted TH-ir neurons were also immunoreactive for the DAT and the enzyme AADC (Figs. 5C–5F). Fos or double TH/Fos immunohistochemistry showed a large number of Fos-ir nuclei in the striatal area surrounding the grafts and innervated by graft-derived TH-ir fibers (i.e., 384 ± 24 nuclei/mm²; Fig. 5H), whereas non-reinnervated striatal areas showed no amphetamine-induced Fos activation.

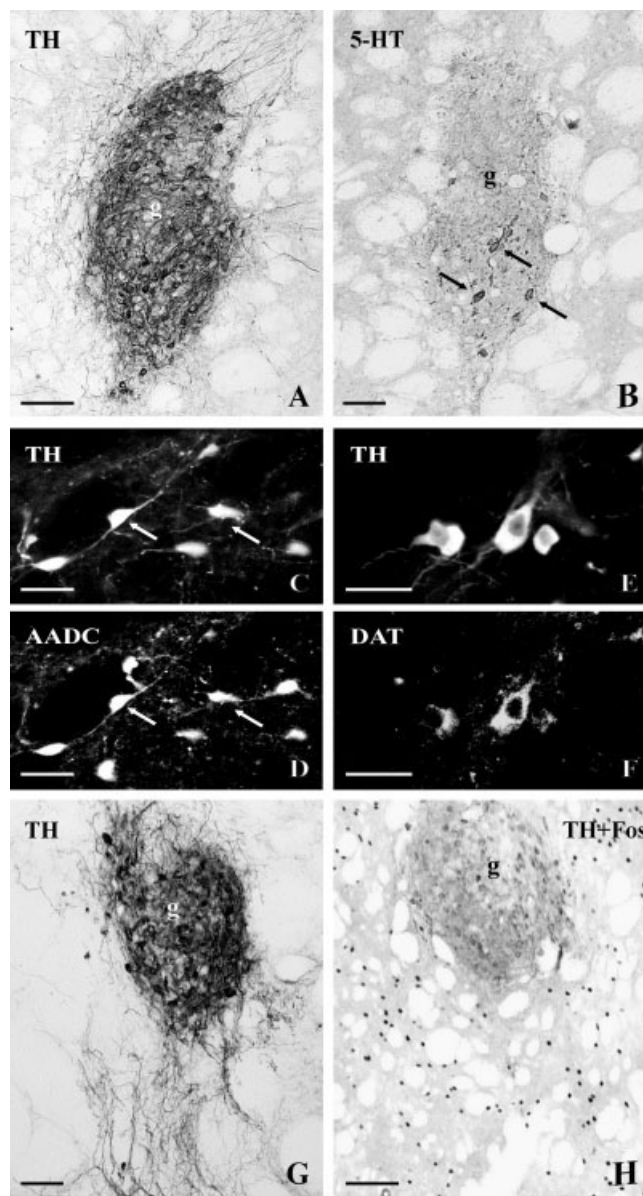


Fig. 5. TH (A, G) or 5-HT (B) immunoreactivity, double immunofluorescence against TH and AADC (C, D), or TH and DAT (E, F), or amphetamine-induced Fos expression (H; i.e., double TH/Fos labeling) in rats subjected to unilateral dopaminergic denervation and grafting with in vitro expanded mesencephalic precursors. TH-ir neurons were densely packed within the graft (g), and numerous TH-ir fibers from the graft innervated the surrounding striatal area (A, G). Some 5-HT-ir neurons were also observed within the grafts (B; arrows). Double labeling studies revealed that TH-positive neurons also expressed AADC (C, D) and DAT (E, F). Injection of amphetamine to the host rat to induce DA release in the grafted terminals led to intense Fos expression in striatal neurons of the reinnervated area (H). Scale bar = 100 μ m (A, B, G, H) and 25 μ m (C–F).

DISCUSSION

Several in vitro methods have been used to generate DA neurons. However, these DA-phenotype cells are frequently unable to survive or exert functional effects in vivo (Arenas, 2002; Hudson et al., 1994; Kim et al., 2003; Zuddas et al., 1991). It has been

observed that even though significant DA release is detected *in vitro*, the cells could exhibit decreased DA release *in vivo* or lack sufficient synaptic interaction with the host brain, another important parameter for long-term graft function (Kim et al., 2003). It is usually considered that *in vitro* generation of rat DA neurons with successful *in vivo* grafting data is currently still limited to cells isolated from ventral midbrain (Kim et al., 2003), although these cells, after transplantation, appear less mature and integrate less well with the host brain compared with primary fetal tissue (Kim et al., 2003; Ostenfeld et al., 2002; Roybon et al., 2004; Svendsen et al., 1996). However, most data on host-brain integration and graft function were obtained by testing the recovery of the lesion-induced rotational behavior. The results of the present study show that the DA cells obtained from mesencephalic precursors and treated with anti-FGF4 antibodies were able to survive for a long time after grafting in DA denervated striata and reinnervate the striatal region surrounding the graft, as well as induce functional responses on the host striatal cells and recovery of the rotational behavior.

We treated the mesencephalic precursors with antibodies against FGF4 during the differentiation period because this treatment induces a marked increase in generation of DA neurons *in vitro*, and a marked decrease in generation of 5-HT neurons (Rodríguez-Pallares et al., 2003). Previous developmental studies have shown that intersection of sonic hedgehog (shh) and fibroblast growth factor 8 (FGF8) creates inductor sites for DA neurons, and when preceded by a third signal (FGF4), the same intersection defines an inductive center for 5-HT neurons (Hynes et al., 1995). In fact, several *in vitro* methods used to generate DA neurons from stem/progenitor cells induce simultaneous generation of serotonergic (5-HT) neurons (Barberi et al., 2003; Björklund et al., 2002; Kim et al., 2002; Lee et al., 2000; Studer et al., 1998). The present results suggest that pretreatment with antibodies against FGF4 do not induce major modification of DA neuronal functions after grafting.

The group of grafts from expanded precursors that induced rotational recovery showed a number of DA cells rather similar to that observed in grafts from primary fetal tissue. The graft volume was, however, much smaller and the density of TH-ir cells much higher than that observed in grafts from primary fetal tissue in the present and other studies (Brundin et al., 1988; Lopez-Martin et al., 1999a; Muñoz et al., 2003). The reduced volume and high concentration of TH-ir neurons observed in grafts from expanded mesencephalic precursors may have a number of advantages over the usual grafts from primary fetal tissue. A high concentration of DA neurons would lead to less focal disruption, and to the possibility of implanting multiple micrografts, which have been shown to

increase functional recovery (Nikkhah et al., 1995; Ramachandran et al., 2002). During the past two decades, it has been observed that fetal cells grafted as cell suspensions reorganize themselves during the graft development period. It has been observed that grafts of cell suspensions from ganglionic eminences organize into areas (i.e., patches) of striatal neurons and areas of nonstriatal neurons (Labandeira-Garcia et al., 1991; Liste et al., 1997). We have previously shown that in grafts from mixed suspensions of fetal mesencephalic and striatal cells, the dopaminergic cells concentrate on the patches of grafted striatal neurons (Lopez-Martin et al., 1999b). In grafts from cell suspensions of primary mesencephalic tissue, DA neurons concentrate at the periphery of the grafts, while the center of the graft is occupied by TH-negative cells, most of which are GABAergic or serotonergic cells (Björklund et al., 2002; Kordower et al., 1996; Mounir et al., 1994). However, the mechanisms that control the cytoarchitecture and organization of different cell populations within fetal grafts have not been clarified. In cell aggregates that were differentiated *in vitro* from mesencephalic precursors, we observed that TH-ir cells appeared within or in close proximity to a central core that was immunoreactive for the floor plate marker FP4. Most of the TH-ir cells were then concentrated at the periphery of the aggregates, forming a cap that surrounded the central FP4-ir area, and the serotonergic cells and fibers formed a cap surrounding that of the TH-ir neurons (see Rodríguez-Pallares et al., 2003). This is different from that observed in the fetal ventral mesencephalon. Similarly, the observed differences in the morphology of the grafts (i.e., TH-ir neurons more densely packed and absence of a central TH-negative area in grafts from *in vitro* expanded mesencephalic precursors) may be related to differences between the cell populations contained in the suspension together with the dopaminergic cells. However, a different experimental design is necessary to investigate this question.

As observed in the present and previous studies using intrastriatal grafts from primary fetal tissue (Cenci et al., 1992, 1993; Lopez-Martin et al., 1999a), DA grafts from expanded precursors reinnervated the surrounding striatal tissue and induced functional responses in host striatal neurons. Several experimental procedures have been used to demonstrate lesion-induced effects and graft-induced recovery. Amphetamine-induced rotational behavior (Dunnett et al., 1981; Ungerstedt and Arbuthnott, 1970) and amphetamine-induced expression of Fos nuclear protein (Cenci and Björklund, 1994; Cenci et al., 1992) are sound procedures. In normal rats, amphetamine injection induces DA release in striatal DA terminals and the subsequent expression of Fos in striatal cells. After unilateral DA denervation, there is no Fos

activation in the denervated striatum and intense rotational asymmetry towards the denervated side (i.e., ipsiversive rotation). The DA cells obtained from expanded precursors were functionally integrated with the host brain, since the results indicate that amphetamine injection induces DA release from the graft-derived terminals and postsynaptic responses in the striatal neurons of the reinnervation area. It is known that functional integration between grafted DA neurons and major host striatal afferents is also necessary for expression of Fos in striatal neurons (Cenci and Björklund, 1994; Muñoz et al., 2003). Functional integration with the host brain was also indicated by the reduction in the amphetamine-induced ipsiversive rotation observed in the present study.

Different methodological procedures used for generation of DA cells from embryonic stem cells or expanded mesencephalic precursors induced a simultaneous generation of 5-HT cells (Barberi et al., 2003; Björklund et al., 2002; Kim et al., 2002; Lee et al., 2000; Studer et al., 1998). Similarly, a population of serotonergic cells were observed within grafts from primary mesencephalic tissue in the present and previous studies (Mounir et al., 1994; Muñoz et al., 2003). Treatment with antibodies against FGF4 reduces the number of 5-HT cells by about 80% and induces a marked increase in the number of DA neurons generated in vitro from expanded mesencephalic precursors (Rodriguez-Pallares et al., 2003). In accordance with this, the number of 5-HT neurons in the grafts from in vitro expanded precursors is lower than that in grafts from primary fetal tissue (i.e., the ratio DA cells to 5-HT cells is higher in functional grafts from in vitro expanded precursors than in grafts from primary fetal tissue; 5:1 and 1.6:1, respectively). However, we do not think that this significantly affects the function of the grafts, even though it has been suggested that the presence of 5-HT neurons within the grafts may be beneficial for DA release (Björklund et al., 2002; De Deurwaerdere et al., 1996). First, because a considerable number of 5-HT neurons are still present within the grafts from expanded precursors. Second, because the results of our previous studies using grafts from primary fetal tissue suggest that there is an interaction between DA terminals from the grafted neurons and host 5-HT terminals within the reinnervation area surrounding the graft, which regulates the graft function (Muñoz et al., 2003). In grafts with a low number of DA neurons and no functional recovery (group C2) the rate is 2:1, which is similar to that observed in grafts from primary fetal tissue (1.6:1). This is probably because of higher death rate of DA cells than of 5-HT cells during the grafting procedures.

In conclusion, DA neurons generated from expanded mesencephalic precursors are able to survive for a long time after grafting and reinnervate

the host striatum, as well as induce functional responses in striatal neurons and recovery of rotational behavior. Furthermore, the results demonstrate that long-term survival and functional integration into the DA denervated striatum can be achieved with DA cells pretreated with antibodies against FGF4. However, not all the grafts contained a sufficient number of DA neurons to induce behavioral recovery, which suggests that both the in vitro and grafting procedures need to be improved.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pilar Aldrey for her excellent technical assistance.

REFERENCES

- Arenas A. 2002. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 57:785–808.
- Barberi T, Klivenyi P, Calingasan N, Hyojin L, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MAS, Studer L. 2003. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 21:1200–1207.
- Björklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen YCC, McNaught KS, Brownell A, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kwang-Soo K, Isacson O. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2344–2349.
- Brundin P, Barbin G, Strecker RE, Isacson O, Prochiantz A, Björklund A. 1988. Survival and function of dissociated dopamine neurons grafted at different developmental stages or after being cultured in vitro. *Dev Brain Res* 39:223–243.
- Cenci MA, Björklund A. 1994. Transection of corticostriatal afferents abolishes the hyperexpression of Fos and counteracts the development of rotational overcompensation induced by intrastriatal dopamine-rich grafts when challenged with amphetamine. *Brain Res* 665:167–174.
- Cenci MA, Kalén P, Mandel RJ, Wictorin K, Björklund A. 1992. Dopaminergic transplants normalize amphetamine- and apomorphine-induced Fos expression in the 6-hydroxydopamine-lesioned striatum. *Neuroscience* 46:943–957.
- Cenci MA, Campbell K, Björklund A. 1993. Neuropeptide messenger RNA expression in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat striatum reinnervated by fetal grafts on preproenkephalin, preprotachykinin and prodynorphin messenger RNA levels. *Neuroscience* 57:275–296.
- De Deurwaerdere P, Bonhomme N, Lucas G, Le Moal M, Spampinato U. 1996. Serotonin enhances dopamine outflow in vivo through dopamine uptake sites. *J Neurochem* 66:210–215.
- Dragunow M, Faull RLM. 1989. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* 29:261–265.
- Dunnett SB, Björklund A, Stenevi U, Iversen SD. 1981. Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res* 215:147–161.
- Dunnett SB, Björklund A, Lindvall O. 2001. Cell therapy in Parkinson's disease: stop or go? *Nat Rev Neurosci* 2:365–369.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson H. 1990. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6912–6916.
- Gundersen HJG, Jensen EB. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147:229–263.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K. 1988. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:379–394.
- Hudson JL, Van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA. 1993. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626:167–174.

- Hudson JL, Bickford P, Johansson M, Hoffer BJ, Stromberg I. 1994. Target and neurotransmitter specificity of fetal central nervous system transplants: importance for functional reinnervation. *J Neurosci* 14:283–290.
- Hynes M, Porter JA, Chiang C, Chang D, Tessier-Lavigne M, Beachy PA, Rosenthal A. 1995. Induction of midbrain dopaminergic neurons by sonic hedgehog. *Neuron* 80:95–101.
- Kim J-Y, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumskey N, Lee S, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. 2002. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418:50–56.
- Kim J-Y, Koh HC, Lee J-Y, Chang M-Y, Kim YC, Chung H-Y, Son H, Lee Y-S, Studer L, McKay R, Lee S-H. 2003. Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by *Nurr1* overexpression. *J Neurochem* 85:1443–1454.
- Kordower JH, Rosenstein JM, Collier TJ, Burke MA, Chen EY, Li JL, Levey AE, Mufson EJ, Freeman TB, Olanow CW. 1996. Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J Comp Neurol* 24:203–230.
- Labandeira-Garcia JL, Victorin K, Cunningham ET, Björklund A. 1991. Development of intrastriatal striatal grafts and their afferent innervation from the host. *Neuroscience* 42:407–426.
- Labandeira-Garcia JL, Tobio JP, Guerra MJ. 1994. Comparison between normal developing striatum and developing striatal grafts using drug-induced Fos expression and neuron-specific enolase immunohistochemistry. *Neuroscience* 60:339–415.
- Lee S-H, Lumskey N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18:675–679.
- Lindvall O. 2003. Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol Res* 47:279–287.
- Lindvall O, Hagell P. 2000. Clinical observations after nigral transplantation in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 127:299–320.
- Liste I, Caruncho HJ, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 1997. GABA_A receptor subunit expression in intrastriatal striatal grafts. Comparison between normal developing striatum and developing striatal grafts. *Dev Brain Res* 103:185–194.
- Lopez-Martin E, Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 1999a. Recovery after nigral grafting in 6-hydroxydopamine lesioned rats is due to graft function and not significantly influenced by the remaining ipsilateral or contralateral host dopaminergic system. *Brain Res* 842:119–131.
- Lopez-Martin E, Caruncho HJ, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 1999b. Striatal dopaminergic afferents concentrate in GDNF positive patches during development and in developing intrastriatal striatal grafts. *J Comp Neurol* 406:199–206.
- Morgan JL, Curran T. 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Ann Rev Neurosci* 14:421–451.
- Mounir A, Chkirate A, Vallée A, Pierret P, Geffard M, Doucet G. 1994. Host serotonin axons innervate intrastriatal ventral mesencephalic grafts after implantation in newborn rats. *Eur J Neurosci* 6:1307–1315.
- Muñoz A, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2003. Host regulation of dopaminergic grafts function: role of the serotonergic and noradrenergic systems in amphetamine-induced responses. *Synapse* 47:66–76.
- Nikkhah G, Cunningham MG, McKay R, Björklund A. 1995. Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of rats with bilateral 6-OHDA lesions. Transplant-induced behavioral recovery. *J Neurosci* 15:3562–3570.
- Ostenfeld T, Joly E, Tai YT, Peters A, Caldwell M, Janiaux E, Svendsen CN. 2002. Regional specification of rodent and human neurospheres. *Brain Res Dev Brain Res* 134:43–55.
- Paxinos G, Watson C. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Ramachandran AC, Bartlett LE, Mendez IM. 2002. A multiple target neural transplantation strategy for Parkinson's disease. *Rev Neurosci* 13:243–256.
- Robertson GS, Vincent SR, Fibiger HC. 1992. D1 and D2 dopamine receptors differentially regulate c-fos expression in striatonigral and striatopallidal neurons. *Neuroscience* 49:285–296.
- Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2003. Elimination of serotonergic cells induces a marked increase in generation of dopaminergic cells in neurospheres. *Eur J Neurosci* 18:2166–2174.
- Roybon L, Christophersen NS, Brundin P, Li J-Y. 2004. Stem cell therapy for Parkinson's disease: where do we stand? *Cell Tissue Res* 318:261–273.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T. 1988. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240:1328–1331.
- Sanchez-Pernaute R, Studer L, Bankiewicz KS, Major EO, McKay RDG. 2001. In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. *J Neurosci Res* 65:284–288.
- Studer L, Tabar V, McKay RDG. 1998. Transplantation of expanded precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* 1:290–295.
- Svendsen CN, Clarke DJ, Rosser AE, Dunnett SB. 1996. Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol* 137:376–388.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW. 1970. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485–493.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482–497.
- Zuñiga A, Corsini GU, Barker JL, Kopin IJ, di Pozio U. 1991. Specific reinnervation of lesioned mouse striatum by grafted mesencephalic dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 3:77–85.

DISCUSIÓN

5- DISCUSIÓN

5.1- EFECTO DE LA SEROTONINA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.

La **serotonina** fue descubierta a mediados de siglo pasado como un potente factor vasotónico. Durante mucho tiempo los efectos de la serotonina en el sistema nervioso fueron atribuidos a sólo dos tipos de receptores, aunque en la actualidad se conocen 14 subtipos codificados por diferentes genes. Estos subtipos han sido agrupados en siete familias en función de su mecanismo de señalización, homología de secuencia y respuesta frente a fármacos. Los receptores de una de estas familias son canales iónicos (5-HT₃) mientras que las otras los receptores están acoplados a proteínas G. Este esquema se complica aún más cuando se comprueba que cada receptor puede tener distintas rutas de señalización acopladas (Hoyer, Hannon y Martin, 2002, Pauwels, 2000). La multiplicidad de rutas de señalización observada para cada subtipo de receptor sugiere que cada uno de ellos es capaz de regular un amplio abanico de señales intracelulares en función del tipo de célula, número de receptores, tipo de proteínas a estos asociadas y el agonista que esté actuando sobre el receptor.

Mediante estas señales se ha descrito que la serotonina a través de sus múltiples receptores es capaz de regular aspectos tan variados de la biología celular como la proliferación, crecimiento, transporte intracelular, diferenciación y la apoptosis (Raymond et al., 2001). El efecto que tiene el sistema serotoninérgico sobre la diferenciación DAérgica es especialmente importante si tenemos en cuenta que es uno de los primeros sistemas de neurotransmisores que se desarrollan en el embrión, intervando en estadios de desarrollo muy tempranos el mesencéfalo ventral.

El uso de metiotepina, fármaco capaz de antagonizar la mayor parte de los subtipos de receptores de serotonina, provoca un aumento en el número de células TH-ir obtenidos a partir de las neuroferas. Este resultado está en consonancia con resultados observados previamente cuando

los niveles de 5-HT en nuestros cultivos fueron reducidos (Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-García, 2003). Sin embargo el empleo de antagonistas selectivos frente a distintos receptores mostró resultados dispares.

Mientras el tratamiento con el antagonista WAY100635, que muestra gran potencia y selectividad sobre receptores 5-HT_{1A}, no mostró diferencias en el número de células DA obtenidas en nuestros cultivos, el uso del antagonista de receptores 5-HT_{1B/1D} GR127935 resultó en un descenso en el número de células TH obtenidas en cultivo. Numerosos estudios indican que estos receptores (5-HT_{1A/1B/1D}) podrían funcionar como autoreceptores durante el desarrollo (Hery et al., 1999; Mouillet-Richard et al., 2000; Roberts, Price y Middlemiss, 2001; Rumajogee et al., 2004). Estos receptores localizados en el soma o en los terminales actuarían regulando la síntesis, liberación y recaptación de la 5-HT. De esta forma la estimulación de receptores 5-HT_{1B} localizados en las terminales induciría una disminución en la liberación de 5-HT al espacio extracelular (Galzin et al., 1992). Los receptores 5-HT_{1A} inhibirían la descarga de neuronas serotoninérgicas (Azmitia, 2001; Hery et al., 1999; Sprouse y Aghajanian, 1987). De este modo se podría explicar que el antagonista de receptores 5-HT_{1B/1D} provoque un incremento en la cantidad de 5-HT liberada al medio que podría actuar a través de otros receptores regulando el número de células DAérgicas.

El antagonista de receptores 5-HT₂ ritanserina también redujo el número de células DAérgicas obtenidas en nuestros cultivos, lo que sugiere que la estimulación de estos receptores favorecería la generación de neuronas DAérgicas. El papel del receptor 5-HT₂ durante el desarrollo ha sido demostrado en diversos estudios. La localización del receptor 5-HT_{2B} en células serotoninérgicas (Bonaventure et al., 2002; Jackson, Stringer y Foster, 1997; Loric et al., 1995; Mouillet-Richard et al., 2000) sugiere que este receptor podría regular la señalización mediada por la serotonina de un modo similar al indicado para los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B/1D}. De este modo podría reducir el número de células DAérgicas mediada por otros receptores serotoninérgicos.

La ritanserina antagoniza a receptores 5-HT₂ y 5-HT₇, aunque la afinidad por los 5-HT₂ es mucho mayor que por los 5-HT₇ (Hoyer et al., 1994; Krobot et al., 2001). El efecto que la ritanserina tiene

antagonizando los receptores 5HT₇ se ve contrarrestado por el efecto que tiene sobre los de tipo 5-HT₂ y los efectos negativos que esto tiene sobre la generación de células DAérgicas. Estudios previos mostraron que el agonista de receptores 5-HT₂ favorece el crecimiento de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en cultivo (Whitaker-Azmitia et al., 1996).

La posibilidad de que los receptores 5-HT₃ estén involucrados en los efectos negativos de la serotonina sobre la generación de neuronas DA fue investigado con el antagonista ondansetron, con resultados negativos.

Los receptores de serotonina tipo 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇ fueron descubiertos recientemente en comparación con los subtipos ya mencionados, siendo en muchos casos confundidas las acciones de unos y otros antes de su descubrimiento. Es por ello que sus características y funciones no son tan conocidas, aunque el patrón de expresión sugiere que pudieran tener alguna función en la ontogénesis del sistema nervioso (Beique et al., 2004; Jackson, Stringer y Foster, 1997; Waeber et al., 1996). El receptor 5-HT₇ es uno de los

Receptor	Humano	Ratón	Rata
5-HT _{1A}	9.7-9.1		
5-HT ₇	9.6-8.1	8.3	9.2-8.7
5-HT _{1D}	9.0-8.0		
5-HT _{1B}	9.0-7.4	8.1	
5-HT _{2B}	8.4-7.9		8.0
5-HT _{1E}	8.2-8.0		
5-HT _{1F}	8.0-7.7		7.2 (pIC ₅₀)
5-HT _{2C}	8.6-6.8		7.9-6.7
5-HT _{2A}	8.4-6.0		6.5-6.0
5-HT ₆	7.5-6.8		7.9-6.6
5-HT _{5A}	6.9-6.7	6.6-6.0	6.6
5-HT ₄	7.0-5.9	7.2	8.2-6.7

Tabla 3: Selectividad de 5-HT por sus receptores en distintas especies (expresado en pK_i, salvo indicado)

Adaptado de la IUPHAR (<http://www.iuphar.org/>)

receptores que mayor afinidad por la serotonina presenta (véase **Tabla 3**), por lo que es capaz de ser activado por bajas concentraciones de serotonina.

Cuando los experimentos de bloqueo de receptores de serotonina fueron realizados no se disponía de antagonistas selectivos para los receptores tipo 5-HT₅. El conocimiento que se tenía hasta entonces era escaso y se basaba en localización y estudios funcionales que sugerían que

podiera funcionar como autoreceptor. Hoy en día ya se han desarrollado antagonistas con especificidad para el receptor 5-HT_{5A} que permitirán conocer las funciones de éste no solo durante la embriogénesis sino también en el sistema nervioso adulto (Thomas et al., 2006).

El tratamiento con antagonistas de los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇ indujo un aumento significativo en el número de células DA obtenidas a partir de neuroesferas. El papel de estos receptores en el aumento en el número de células DA que se obtiene cuando se reduce la población 5-HTérgica fue estudiado mediante el uso de agonistas específicos en cultivos tratados con la neurotoxina serotoninérgica 5,7-DHT. Estos agonistas fueron capaces de atenuar el aumento en el número de células DAérgicas inducido por neurotoxina, lo que apoya a la idea de que son estos receptores 5-HT₄ y 5-HT₇ los responsables de la inhibición de generación de neuronas DAérgicas producida cuando sus precursores se diferencian en presencia de 5-HT.

El tratamiento con antagonistas del receptor 5-HT₆ no produjo cambios significativos en el número de neuronas DA obtenido.

La serotonina también podría tener efectos sobre la diferenciación de células a través de la entrada de este aminoácido por transportadores de membrana, como sugieren varios estudios (Buznikov, Lambert y Lauder, 2001; Fanburg y Lee, 1997; Rumajogee et al., 2004). El transportador de 5-HT (5-HTT) se expresa tempranamente en neuronas serotoninérgicas (Stringer, Verhofstad y Foster, 1994; Yamamoto, Steinbusch y Jessell, 1981) así como en neuronas no serotoninérgicas durante el desarrollo (Galter et al., 1999; Hansson, Mezey y Hoffman, 1998; Zhou, Sari y Zhang, 2000). El bloqueo del 5-HTT mediante fluoxetina provocó un descenso en la generación de células DAérgicas obtenidas a partir de precursores, contrariamente a lo que cabría esperar si el observado aumento de células DAérgicas fuera debido a la limitada captación de este neurotransmisor por el transportador 5-HTT. El descenso en el número de células DAérgicas entonces observado con el tratamiento con fluoxetina puede ser atribuido a una mayor disponibilidad de 5-HT en el espacio extracelular (Fuller, 1995) y los efectos sobre receptores antes mencionados.

Células no serotoninérgicas, incluidas las dopaminérgicas de la SN, son capaces de captar serotonina in vivo e in vitro, así como su precursor 5-HTP y decarboxilarlo a 5-HT (Lynn-Bullock et al., 2004; Stringer, Verhofstad y Foster, 1994). El transportador de DA (DAT), específico de células DAérgicas, es capaz de captar 5-HT cuando el transporte mediado por 5-HTT se ve afectado (Zhou, Lesch y Murphy, 2002). Para bloquear la captación de 5-HT en células DAérgicas es necesario el uso de un inhibidor específico de este transportador. El uso de este inhibidor redujo el número de células DAérgicas obtenidas, por sí solo o en tratamiento simultáneo con un inhibidor del 5-HTT, lo que sugiere la captación de este neurotransmisor puede ser beneficioso para la especificación o mantenimiento del fenotipo DAérgico en nuestros cultivos (Du y Iacovitti, 1995; Riaz et al., 2004; Stull y Iacovitti, 1996).

5.2- EFECTO DEL GABA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.

Las neuronas GABAérgicas, al igual que las serotoninérgicas, aparecen muy temprano durante el desarrollo. Se ha observado que regula distintos aspectos de la neurogénesis tanto en el embrión como en el adulto (Barker et al., 1998; Ben-Ari, 2002; Nguyen et al., 2001; Nguyen et al., 2003; Owens y Kriegstein, 2002a).

La administración de **GABA** en cultivos de neuroesferas de progenitores de origen mesencefálico en diferenciación no provocó cambios significativos en el número de células DAérgicas obtenidas. Resultados similares fueron obtenidos en cultivos de tronco cerebral o neuronas hipocámpales, donde el GABA o sus agonistas no afectaron al tamaño de las poblaciones GABA-ir, 5-HTir o TH-ir. Sin embargo el uso de antagonistas de receptores GABA_A como la bicuculina, tenían efectos tróficos sobre estas poblaciones (Barbin et al., 1993; Guo et al., 2002; Lauder et al., 1998; Liu et al., 1997; Ugarte, Homanics y Hammond, 2001).

Se demostró la expresión de receptores GABA_A en cultivos de progenitores mesencefálicos tras

un periodo de diferenciación de una semana. Estudios previos en precursores mesencefálicos mostraron la presencia de este receptor en la mitad de las precursores neuronales (Schlesinger et al., 2004). La bicuculina usada en nuestros cultivos produjo un aumento significativo en el número de células TH-ir obtenidas tras la diferenciación de las neurosféricas. La estimulación del receptor GABA_A podría, por lo tanto, reducir la generación de células DAérgicas en cultivo.

La bicuculina también puede actuar como antagonista de receptores de **glicina** con moderada afinidad (Jonas, Bischofberger y Sandkuhler, 1998; O'Brien y Berger, 1999). Su acción sobre receptores de glicina podría ser la responsable del efecto observado cuando se emplea este fármaco, y ser independiente de su actividad sobre receptores GABA_A. Se ha demostrado la presencia de receptores de glicina en células diferenciadas a partir de neurosféricas, capaces de desempeñar funciones tróficas durante su desarrollo (Nguyen et al., 2002). La estricnina es un alcaloide que actúa antagonizando los receptores de glicina con gran afinidad. El uso de este fármaco provoca un descenso en el número de células DAérgicas obtenidas en nuestros cultivos, al contrario de lo observado con la bicuculina. Esto sugiere que los efectos observados tras el tratamiento con bicuculina son debidos al antagonismo de los receptores GABA_A y no al bloqueo de los de glicina. Los mecanismos involucrados en este descenso no han sido estudiados en este trabajo.

El tratamiento con antagonistas de GABA_B, CGP55845 o CGP54626, reduce de forma significativa el número de células TH-ir obtenidas en nuestros cultivos, lo que sugiere que la estimulación de este receptor podría aumentar la generación de células DAérgicas. El papel de los receptores tipo GABA_B en el desarrollo embrionario no ha sido tan estudiado como el que lleva a cabo el tipo GABA_A, aunque debido a su expresión temprana en el desarrollo ya había sido propuesto como candidato para regular la proliferación, migración y la maduración neuronal (Li et al., 2006). Un reciente estudio ha mostrado que la activación del receptor GABA_B favorece la diferenciación de progenitores hacia el fenotipo neuronal, mientras que en mutantes que carecen de este receptor el número de células gliales que se diferencian es mayor en detrimento del número de neuronas

(Fukui et al., 2008).

El tratamiento simultáneo con antagonistas de ambos receptores de GABA no produjo diferencias significativas en el número de células TH-ir.

5.3- EFECTO DE LA ANGIOTENSINA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.

Los experimentos realizados con el neuropéptido **angiotensina II** (All) muestran que induce el aumento en el número de células DAérgicas a partir de sus precursores cuando es añadida durante el periodo de diferenciación.

La mayor parte de las acciones conocidas de la All, como la regulación de la presión sanguínea y el equilibrio electrolítico, están mediadas por receptores AT₁ en el cerebro adulto (Nuyt et al., 2001; von Bohlen und Halbach y Albrecht, 2006), mientras que durante el desarrollo fetal el receptor AT₂ es hasta 10 veces más abundante que el AT₁, lo que sugiere que podrían tener especial relevancia en procesos ontogenéticos del sistema nervioso (Gendron, Payet y Gallo-Payet, 2003; Grady et al., 1991; Nuyt et al., 1999; Stoll y Unger, 2001; de Gasparo y Siragy, 1999). Sin embargo la función de la All en el desarrollo del sistema nervioso y la localización de sus receptores en neuronas y células gliales es poco conocida.

Mediante inmunomarcaje hemos observado la expresión de receptores de All tipo AT₁ y AT₂ en agregados celulares obtenidos a partir de neurosféricas de precursores mesencefálicos diferenciadas durante siete días. Ambos receptores fueron localizados en células gliales y neuronas, incluyendo neuronas TH-ir en las que el marcaje para el receptor AT₂ es más intenso.

Distintos estudios muestran que en individuos adultos las células DAérgicas poseen abundantes AT₁ tanto en el soma localizado en la SNpc como en las terminales en el estriado, donde facilita la liberación de DA (Brown et al., 1996; Jenkins, Mendelsohn y Chai, 1997). La densidad de receptores AT₁ se ha visto disminuida en el estriado de pacientes con EP (Allen et al., 1992; Ge y Barnes, 1996). Estudios en el cerebro de rata entre E11 y 28 días tras el nacimiento (P28) han

detectado los receptores AT₁ y AT₂ en la SNpc solamente tras el nacimiento (Nuyt et al., 1999; Nuyt et al., 2001). Se ha observado en ratas que tras el nacimiento y a medida que madura la expresión de AT₁ o aumenta o al menos permanece estable, pero el AT₂ sufre un declive en su expresión y densidad, decayendo de forma abrupta. La elevada expresión de los receptores AT₂ durante el desarrollo y su brusca desaparición posterior sugiere que podría estar involucrado en el desarrollo y diferenciación celular.

El efecto de la AII sobre la diferenciación de células DAérgicas no fue alterado cuando se añadió el antagonista de receptores AT₁ ZD 7155, pero fue bloqueado cuando se utilizó PD123319, antagonista de los receptores tipo AT₂, lo que sugiere que son estos receptores los que median el efecto de la AII sobre la diferenciación de los precursores mesencefálicos. Además el antagonista PD123319 es capaz, por si solo o en presencia de AII, de afectar a la longitud de las neuritas.

El efecto que la AII tiene en el crecimiento neurítico es controvertido, habiendo estudios que muestran que es capaz de inhibir su crecimiento, estimularlo a través de receptores AT₁ o a través de receptores AT₂ (Cote et al., 1999; Laflamme et al., 1996; Meffert et al., 1996; Moeller et al., 1996; Reed et al., 1996; Stroth et al., 1998; Yang, Shaw y Raizada, 2002). El tipo AT₂ también ha sido relacionado con la promoción de la regeneración axonal en los nervios ciático y óptico (Gallinat et al., 1998; Lucius et al., 1998; Reinecke et al., 2003).

El tratamiento con cada uno de los antagonistas de AT₁ y AT₂ (sin AII añadida) no tuvo efectos significativos sobre el número de células TH-ir. Esto sugiere que los niveles de AII que se logran en nuestros cultivos están por debajo del nivel requerido para afectar a la generación de células DAérgicas a partir de sus precursores.

Distintos trabajos muestran que la expresión del AT₂ puede ser inducida por la adición de citoquinas al cultivo, factores que favorecen el generación de neuronas dopaminérgicas a partir de precursores mesencefálicos como la interleucina 1 β , el factor de crecimiento tipo insulina 1 o el interferón γ (Horiuchi et al., 2000; Ichiki y Inagami, 1995; Inagami y Senbonmatsu, 2001;

Kambayashi et al., 1996).

Es por ello que mediante la manipulación de componentes del sistema renina-angiotensina, como puede ser la administración de All o agonistas del receptor AT₂, por si sola o en combinación con la adición de diversos factores, puede ser un método efectivo para la obtención de un mayor número de neuronas DAérgicas a partir de células precursoras.

5.4- EFECTO DE SONIC HEDGEHOG SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.

Durante el desarrollo Shh y FGF8 regulan conjuntamente el desarrollo de las poblaciones DAérgicas y 5-HTérgicas del mesencéfalo ventral, siendo requeridas ambas señales para la inducción de estas neuronas en esta zona del tubo nervioso (Hynes y Rosenthal, 1999; Roussa y Krieglstein, 2004; Ye et al., 1998). Además del papel en la especificación neuronal, Shh se ha mostrado capaz de favorecer la supervivencia de distintos tipos neuronales en el mesencéfalo (Cai, Thorne y Gabel, 2008; Miao et al., 1997). Es por ello que un descenso en el número de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas es lo esperado cuando tratamos neuroesferas de precursores mesencefálicos con anticuerpos anti-Shh. Cuando añadimos este anticuerpo al cultivo observamos un descenso en el número de células GABAérgicas y 5-HTérgicas obtenidas en cultivo y sin embargo el número de células DAérgicas no solo no descendió sino que se vio incrementado respecto a cultivos control sin anticuerpo.

Los agregados celulares obtenidos a partir de precursores mesencefálicos en proliferación muestran en este y en estudios previos un patrón de diferenciación equivalente al que sucede en el tubo nervioso en desarrollo (Abeliovich y Hammond, 2007; Placzek y Briscoe, 2005; Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-Garcia, 2003). Al inicio de la diferenciación en cultivo la mayor parte de las células muestran inmunoreactividad al marcador de placa basal FP4 siendo las células TH-ir muy escasas. Estas comienzan a aparecer en la zona de células FP4-ir o adyacentes a esta,

para luego migrar hacia la periferia y rodear el núcleo de células FP4-ir. Las células 5-HTérgicas también surgen próximas a la zona central FP4-ir y posteriormente se situarán en la superficie rodeando la capa de células TH-ir (Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-Garcia, 2003) en un patrón similar al de las células en el tubo nervioso en desarrollo (Abeliovich y Hammond, 2007; Placzek y Briscoe, 2005).

El anticuerpo añadido a nuestros cultivos sería capaz de neutralizar la molécula de Shh impidiendo o dificultando su interacción con las células diana. Se ha sugerido que Shh activa la proteína Ptc presente en células en las que se expresa, o en células próximas tras el procesamiento de la molécula Shh y la liberación de un fragmento señalizador. Ptc podría activar Smo tanto en la propia célula como en células próximas. Ptc no es solo un receptor en la señalización mediada por Shh, sino que es capaz de interactuar con la molécula “secuestrándola” (Chen y Struhl, 1996). Además, debido a que Ptc es una diana de la transcripción mediada por Shh, su regulación sirve para amortiguar la señalización de Shh a lo largo del tiempo (Dellovade et al., 2006). Recientemente se ha descubierto que Shh puede regular el fenotipo en función no solo de la concentración, sino del tiempo durante el cual están expuestos los progenitores al morfógeno (Dessaud et al., 2007). Al añadir ciclopamina, un inhibidor de la ruta de señalización de Shh canónica, no se ha logrado el mismo efecto.

Los resultados obtenidos en cultivos tratados con anticuerpo anti-Shh sugieren que Shh endógeno regula la generación de neuronas DAérgicas, 5-HTérgicas y GABAérgicas a partir de precursores mesencefálicos.

5.5- PRESENCIA DE LA SEÑAL EN EL CULTIVO

En la diferenciación celular intervienen tanto factores genéticos intrínsecos a la propia célula como la influencia de factores extrínsecos provenientes del medio, de otras células o incluso de la misma célula de manera autocrina. Las moléculas cuya relación con la diferenciación de células DAérgicas se ha estudiado podrían ser sintetizadas en el propio cultivo e influir así en el desarrollo de los precursores mesencefálicos. Así se ha observado el efecto que tienen distintos fármacos que bloquean la señalización mediada por 5-HT, GABA y Shh en la diferenciación de células DAérgicas sin necesidad de añadir al medio de cultivo estas sustancias, lo que sugiere que estaban presentes y afectaban al desarrollo de los precursores DAérgicos.

5.5.1- SEROTONINA

La **serotonina** presente en nuestros cultivos proviene tanto de la síntesis por parte de las células serotoninérgicas que se diferencian de las neurosféricas como del suero fetal bovino (FBS) añadido durante la etapa de diferenciación (Hirst et al., 1997). La presencia de células serotoninérgicas en nuestros cultivos ha sido demostrada en estos estudios así como en trabajos previos (Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-García, 2003). Otros autores han mostrado que el desarrollo de células 5-HTérgicas puede ser inducido al mismo tiempo que el de las DAérgicas (Lee et al., 2000).

La concentración de serotonina presente en el FBS es de entre 10 y 50 μ M (Fecteau Y Eiler, 2001), por lo que en el medio de cultivo la concentración debe de ser próxima a 1-5 μ M (Lambert y Lauder, 1999; Rumajogee et al., 2005), valor que está lejos de ser la concentración efectiva para la diferenciación del fenotipo serotoninérgico indicado en otros artículos (Liu y Lauder, 1991; Riaz et al., 2004; Zhou y Iacovitti, 2000). La concentración de 5-HT proveniente del FBS tampoco es capaz de compensar la inhibición en la síntesis de serotonina por parte de células serotoninérgicas en nuestros cultivos que provoca la DL-p-clorofenilalanina (pCPA) ni la bajada de sus niveles

debidos a la reducción de la población serotoninérgica lograda mediante el uso de la neurotoxina 5,7-DHT o anticuerpos frente a FGF-4 (Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-García, 2003).

5.5.2- GABA

Se ha sugerido que el **GABA** exógeno añadido al medio no afecta a la diferenciación de los progenitores debido a la presencia de este neurotransmisor en el medio de cultivo. Este GABA proviene del suero presente en el medio de cultivo (Jelitali et al., 2004; Jow et al., 2004), pero también de la síntesis *de novo* a partir de las células presentes en cultivo. La diferenciación hacia células GABAérgicas sucede de forma espontánea en cultivos de células troncales embrionarias y neurales, obteniéndose un elevado número de células que expresan este fenotipo en cultivos de distintos orígenes (Arenas, 2002; Barberi et al., 2003; Berninger, Guillemot y Gotz, 2007). Numerosas células GABAérgicas pueden ser identificadas en nuestros cultivos, y la producción de GABA y su liberación al medio de cultivo podría ser la razón de que el GABA añadido no tuviera efectos sobre el número de células DA obtenidas. Se ha descrito la síntesis de GABA por parte de células gliales (Jow et al., 2004), aunque la reducción de la población glial con AraC no parece afectar a los niveles de GABA capaces de afectar a la diferenciación dopaminérgica en nuestros cultivos (ver más adelante 5.7- POBLACIONES NEURALES IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA). De hecho, el tratamiento con antagonistas de receptores GABA_A y GABA_B afecta al número de células obtenidas en ausencia de GABA añadido. La expresión de GAD, la enzima responsable de la síntesis del GABA, se puede observar en E10.5 en ratón. Además durante el desarrollo se traducen de modo secuencial distintos mensajeros producidos a partir del mismo ARNm procesado de distintas formas, lo cual sugiere que podrían tener funciones diferentes durante el desarrollo y diferenciación neuronal (Szabo, Katarova y Greenspan, 1994). Durante este periodo, antes de que las células desarrollen los mecanismos necesarios para la internalización en vesículas del GABA, su liberación sucede a través del transportador de GABA, GAT, que puede actuar de modo bidireccional (Varju et al., 2001).

5.5.3- ANGIOTENSINA II

Las observaciones realizadas en nuestro laboratorio sugieren que la síntesis de **angiotensina** por parte de las células obtenidas a partir de precursores neuronales en proliferación diferenciados in vitro no es suficiente como para afectar al número de células DAérgicas obtenidas en cultivo.

La angiotensina tiene un origen más tardío que la serotonina y el GABA durante el desarrollo embrionario, alrededor de E18 en ratas (Sernia, 1995). A pesar de que el cerebro posee un RAS propio, parece que ninguna célula presenta toda la maquinaria de síntesis de Angiotensina II, sino que los distintos componentes de su ruta de síntesis se hayan dispersos en el sistema nervioso (von Bohlen und Halbach y Albrecht, 2006).

5.5.4- SONIC HEDGEHOG

La presencia de **Shh** en nuestros cultivos ha sido demostrada mediante el uso de un anticuerpo específico. Numerosas células procedentes de neuroesferas de precursores mesencefálicos muestran inmunoreactividad para Shh, principalmente localizadas próximas a la zona central de los agregados celulares. El Shh sintetizado por las propias células FP4-ir presentes en el mesencéfalo es suficiente para inducir las neuronas TH-ir y 5-HT-ir halladas en cultivo en caso de requerirlo, ya que la adición de Shh exógeno no es necesaria para la diferenciación de estos fenotipos neurales. La presencia de Shh endógeno se ve además apoyada por el hecho de que el anticuerpo anti-Shh por sí solo (sin adición de Shh exógeno al medio de cultivo) tenga efectos en el tamaño de las poblaciones neurales obtenidas en cultivo. Numerosos estudios anteriores mostraron que la administración de Shh exógeno no logra incrementar la diferenciación de células DAérgicas a partir de neuroesferas de precursores neurales in vitro (Lee et al., 2000; Ostensfeld et al., 1999; Sakurada et al., 1999; Stull y Iacovitti, 2001; Svendsen, Caldwell y Ostensfeld, 1999). Esto puede ser explicado por el hecho de que Shh puede ser sintetizado en los propios cultivos por los precursores neurales, regulando tanto su desarrollo y supervivencia como los de las células vecinas (Rafuse et al., 2005; Roussa et al., 2006).

5.6- POSIBLES MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN EMPLEADOS.

5.6.1- SEROTONINA

Los receptores de **serotonina** han sido agrupados en 7 familias, 5-HT₁₋₇. Se sabe que muchos de los genes que los codifican se procesan de varios modos (presentan variantes de “splicing”) por lo que son al menos 30 proteínas distintas las que actúan como receptores de 5-HT. La serotonina interacciona con estos receptores con distintos efectos, a veces contrapuestos. El receptor 5-HT₃ es el único de los receptores de 5-HT descubierto hasta el momento cuya estructura es la de un canal iónico dependiente de ligando (la 5-HT) que actúa como receptor ionotrópico. El resto de los receptores de 5-HT están ligados a proteínas G. Los tipo 5-HT₁ suelen estar ligados a la inhibición del enzima adenilato ciclasa (AC) y un descenso en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Muchas de las funciones atribuidas a los neurotransmisores han sido vinculadas a su papel en los niveles del AMPc (Lauder, 1993). Análogos de este mensajero pueden actuar promoviendo la proliferación de las neuronas DAérgicas, su diferenciación y supervivencia (Lara et al., 2003; Michel y Agid, 1996; Pliego Rivero et al., 1999; Riaz y Bradford, 2005; Riaz et al., 2002). La activación de la AC a través de distintos receptores provoca un aumento en los niveles de AMPc. Este AMPc activa a la proteín kinasa dependiente de AMPc (PKA), que fosforilará distintos sustratos en el interior de la célula. Finalmente proteínas reguladoras fosforiladas son translocadas al núcleo donde interaccionan con secuencias promotoras del gen de la TH (Riaz et al., 2002; Riaz et al., 2002).

Los 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ también están acoplados a la AC pero su señalización provoca su activación y la elevación de los niveles de AMPc en el interior celular (y como consecuencia la activación de la PKA). Los 5-HT₂ actúan estimulando la fosfolipasa C en la mayor parte de los tejidos y células en los que se expresa (Raymond et al., 2001). El 5-HT₅ es el menos conocido de

los receptores de serotonina, y parece relacionado con la inhibición de la AC (Carson et al., 1996; Noda et al., 2004).

Este esquema se complica aún más cuando se comprueba que cada receptor puede tener distintas rutas de señalización acopladas (Hoyer, Hannon y Martin, 2002; Pauwels, 2000).

Debido al papel que el AMPc tiene sobre el desarrollo de las células DAérgicas y la expresión de TH, llama la atención la reducción en la generación de células DA en respuesta a la acción de agonistas capaces de elevar los niveles de este mensajero. Sin embargo si se observa por medio de técnicas inmunocitoquímicas la expresión de estos receptores en nuestros cultivos se puede observar que se encuentran localizadas en células serotoninérgicas y gliales, hallándose el 5-HT₄ solamente en unas pocas células DA (ver 5.7- POBLACIONES NEURALES IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA).

5.6.2- GABA

El bloqueo de los tipos de receptores **GABA** estudiados, GABA_A y GABA_B, tiene efectos contrapuestos en la generación de células DAérgicas a partir de sus precursores. El bloqueo del receptor GABA_A provoca un aumento en el número de células DAérgicas. El receptor GABA_A actúa como un canal de Cl⁻ dependiente de ligando. Al contrario de lo que sucede en el cerebro adulto el GABA actúa como neurotransmisor excitador durante el desarrollo temprano (Leinekugel et al., 1999), porque debido a la concentración de iones en células inmaduras cuando el canal de Cl⁻ se abre provoca la despolarización de la membrana y un aumento en el Ca⁺⁺ citosólico. La inversión en la señalización entre el desarrollo embrionario y la que presentan las células maduras sugiere un papel durante el desarrollo muy específico distinto del que tiene posteriormente y en el cerebro adulto. Se ha demostrado que los receptores GABA_A pueden activar distintas rutas de señalización y que de esta forma regula la expresión génica (Obrietan y van den Pol, 1997; Obrietan, Gao y van den Pol, 2002), pudiendo de este modo regular la diferenciación y maduración de las células DAérgicas.

El receptor GABA_B, por el contrario, es un receptor metabotrópico que activa diversas vías intracelulares y su bloqueo induce un descenso en el número de células DAérgicas obtenidas a partir de precursores mesencefálicos.

El efecto que el antagonista del GABA_A tiene en la generación de células DAérgicas es contrarrestado al añadir el antagonista de receptores GABA_B. El antagonismo de un tipo de receptor suprimiría o reduciría la señalización por éste mediada, pero al mismo tiempo favorece la disponibilidad del GABA presente en el cultivo que podría facilitar la estimulación de los receptores no inhibidos con el antagonista. El efecto contrapuesto de los receptores GABA_A y GABA_B también podría servir para explicar la falta de efecto del GABA añadido a nuestros cultivos, ya que al actuar como agonista de ambos receptores el efecto de unos receptores sería enmascarado por el de los otros.

Cuando los receptores tipo GABA_A y GABA_B son antagonizados simultáneamente no se observan cambios en el número de células TH-ir, lo que sugiere que no hay otros mecanismos o receptores a través de los cuales el GABA pudiera afectar a la generación de neuronas DAérgicas en nuestros cultivos.

5.6.3- ANGIOTENSINA II

La señalización mediada por el receptor de **angiotensina II** AT₁ ha sido estudiada en numerosos tejidos desde hace tiempo y es bien conocida, sobre todo en lo concerniente a la regulación acciones clásicas mediadas por la AII. El receptor AT₂, que media la acción de la AII en nuestros cultivos, es también una proteína G que puede estar acoplada a múltiples rutas de señalización (Gallinat et al., 2000). Sin embargo su señalización precisa no está bien aclarada ya que aparecen involucradas vías de señalización no convencionales cuya ruta no es del todo conocida y algunas de las funciones del AT₂ no han podido ser atribuidas a ningún mecanismo de señalización y viceversa (Steckelings, Kaschina y Unger, 2005). Diversos estudios concuerdan en que está ligada a fosfatasas y que los efectos que produce son los contrapuestos a los mediados por los

receptores AT₁ (AbdAlla et al., 2001; Gallinat et al., 2000; Gelband et al., 1997; Holownia y Braszko, 2007; Wilms et al., 2005; von Bohlen und Halbach y Albrecht, 2006). Así se ha sugerido que a través de la activación de la tirosina fosfatasa y a la inhibición de las MAP quinasas favorece la detención de la proliferación y la entrada en apoptosis, aunque es dependiente de la maquinaria de señalización celular, siendo muy variable la respuesta en distintos tejidos (Inagami y Senbonmatsu, 2001; von Bohlen und Halbach y Albrecht, 2006).

Se ha sugerido que el efecto de los receptores tipo AT₂ depende del entorno celular en el que se encuentra (Gendron, Payet y Gallo-Payet, 2003). Numerosos estudios han descrito efectos contrapuestos entre los receptores AT₁ y los AT₂ (AbdAlla et al., 2001; Huang, Richards y Sumners, 1996; Stoll y Unger, 2001). En células NG108-15 indiferenciadas que expresan sólo receptores tipo AT₂ la AII induce el crecimiento neurítico, mientras que cuando se induce su maduración y expresan ambos tipos de receptores, la AII induce cambios en el citoesqueleto de las neuritas, que se acortan (Gendron et al., 2002; Laflamme et al., 1996).

5.6.4- SONIC HEDGEHOG

La señalización mediada por **Shh** tiene varias particularidades que la diferencian de las rutas vistas hasta el momento. La vía clásica o canónica se caracteriza por estar mediada por las proteínas Patched, Smoothened y Gli. Patched (Ptc) es una proteína transmembrana que podría actuar como transportador y que en ausencia de Shh inhibe de forma constitutiva a Smoothened (Smo). Smo también se sitúa en la membrana plasmática y parece actuar acoplado a proteínas G. La unión de Shh al receptor Ptc provoca la desinhibición de Smo, cuya actividad intracelular tendría como consecuencia la activación de factores de transcripción intracelulares de la familia Ci/Gli responsables de la activación génica regulada por Shh (Marti y Bovolenta, 2002).

La cliclopamina inhibe la activación de Smo y la posterior cascada de señalización, tal y como se demostró para el gen *gli1* regulado por Smo mediante RT-PCR. Distintos estudios sugieren que el factor de transcripción codificado por este gen es necesario para la especificación temprana de

fenotipo DAérgico (Zervas et al., 2004). El tratamiento con ciclopamina no provoca cambios significativos en el número de células TH-ir, 5-HT-ir o GABA-ir. Este resultado sugiere que los efectos de Shh sobre los precursores mesencefálicos no están relacionados con la ruta de señalización tradicionalmente atribuida a Shh, a pesar de que esta sigue activa y puede ser bloqueada con la ciclopamina en nuestros cultivos, tal y como demostramos mediante RT-PCR. Distintos estudios han sugerido recientemente la posibilidad de que algunas de las acciones mediadas por Shh sean independientes de la ruta Ptc-Smo-Gli. (Jenkins, Winyard y Woolf, 2007; Riobo y Manning, 2007; Testaz et al., 2001; Thibert et al., 2003; Zhang et al., 2007), aunque los mecanismos de señalización implicados en estos casos no están claros.

Además se han mostrado acciones contrapuestas entre la señalización por Shh y la de la PKA. El tratamiento con fármacos que activan la AC, análogos del AMPc o inhibidores de su degradación antagonizan la inducción mediada por Shh (Fan et al., 1995; Hynes et al., 1995b; Sakurada et al., 1999). Al mismo tiempo la activación del PKA mediada por estas moléculas favorece la generación de neuronas TH-ir. Estudios en líneas celulares mostraron que mientras que Shh induce la expresión de TH en aquellas células que adquirirán el fenotipo DAérgico, reduce su expresión en el desarrollo posterior de las neuronas actuando sobre dos rutas de señalización dependientes de AMPc, la de la PKA y la de la proteína CREB (del inglés cAMP-responsive element binding)(Kwon et al., 2006). Por ello Shh podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la diferenciación de las células DAérgicas.

5.7- POBLACIONES NEURALES IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA

Los precursores mesencefálicos en ausencia de mitógenos se diferencian espontáneamente a células gliales y neuronas, incluyendo neuronas DAérgicas, GABAérgicas, 5-HTérgicas y colinérgicas (Jensen et al., 2007; Studer, Tabar y McKay, 1998). Casi todos estos fenotipos fueron identificados mediante inmunohistoquímica en nuestros cultivos.

La localización de los receptores de serotonina 5-HT₄ y 5-HT₇ en células gliales y serotoninérgicas obtenidas en cultivo de neurosféricas mesencefálicas apunta a estas poblaciones neurales como las mediadoras del efecto de la serotonina en las células DAérgicas. Los receptores de GABA han sido localizados en neuronas DAérgicas en nuestros cultivos, así como en otras poblaciones como neuronas serotoninérgicas y células gliales. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en estudios anteriores (Kim, Nakajima y Nakajima, 1997; Schlesinger et al., 2004; Wirtshafter y Sheppard, 2001), y sugieren que los efectos del GABA podrían ser tanto directos sobre las células DAérgicas o sus precursores como indirectos sobre otras poblaciones también presentes cultivo. El efecto que la AII tiene sobre la obtención de células DAérgicas también fue estudiado en relación con otras poblaciones neurales presentes en cultivo. El efecto de la AII pudiera ser indirecto regulando la señalización de células gliales o neuronales, o a través del control del número de células de otros fenotipos y así repercutir sobre el número de células DAérgicas halladas tras la diferenciación.

5.7.1- CÉLULAS GLIALES

Las **células de la glía** tienen un importante papel durante el desarrollo del sistema nervioso. Se ha sugerido que las células de la glía radial son progenitores de las células DAérgicas en el mesencéfalo en desarrollo, con información regional de acuerdo con la zona en la que se

desarrollan, y que originarían neuronas tras dividirse asimétricamente. Posteriormente proveerían a las células hijas de señales instructivas ligadas a su membrana y/o solubles, para especificar el fenotipo (Hall et al., 2003) o favorecer la supervivencia (Li et al., 2006) de las células DAérgicas.

La importancia de las células gliales en los efectos mediados por **serotonina** ya había sido puesta de manifiesto anteriormente (Liu y Lauder, 1991; Liu y Lauder, 1992). La localización e importancia de receptores 5-HT₇ en astrocitos de rata ya había sido indicada anteriormente (Hirst et al., 1997; Hirst et al., 1998). Mediante AraC, que reduce el número de astrocitos obtenidos en cultivo al inhibir su proliferación, se evita el aumento en el número de células DA que se diferencian en presencia de antagonistas de receptores 5-HT₄ y 5-HT₇. Esto sugiere que los receptores gliales 5-HT₄ y 5-HT₇ tienen una importante función en el efecto negativo que la 5-HT tiene sobre la generación de células DAérgicas. Además se observó una reducción en el número de células serotoninérgicas obtenidos simultáneamente al aumento en la generación de células DAérgicas en respuesta al bloqueo de receptores 5-HT₇. Esto sugiere que las células de la glía favorecerían la inducción y/o supervivencia de neuronas 5-HT a partir de los precursores a expensas de las DAérgicas. El efecto predominante de la estimulación de astrocitos con 5-HT es el incremento de la producción de AMPc (Hirst et al., 1998), efecto mediado principalmente por receptores 5-HT₇ (Hirst et al., 1997). Estudios realizados en células 5-HTérgicas mostró que cuando agonistas que aumentan los niveles de cAMP en células gliales son añadidos al cultivo estas células gliales secretan algún tipo de factor que estimula el crecimiento de las células serotoninérgicas. Además se ha observado que las neuronas 5-HT en desarrollo pueden regular la producción de factores de crecimiento por medio de la activación de receptores en células mesencefálicas gliales, pudiendo actuar estos factores selectivamente sobre neuronas serotoninérgicas sin afectar a las DAérgicas, y viceversa (Whitaker-Azmitia et al., 1996). Estudios previos mostraron que en aquellos estudios en los que los análogos de AMPc producían un incremento en el número de células DAérgicas, las células gliales presentes en estos cultivos no eran las responsables de este efecto (Michel y Agid, 1996).

Las células gliales presentan receptores de **GABA** (Bureau et al., 1995; Charles et al., 2003; Fraser, Mudrick-Donnon y MacVicar, 1994; Kettenmann y Schachner, 1985) que median algunas de las funciones de los astrocitos durante el desarrollo (Matsutani y Yamamoto, 1997; Matsutani y Yamamoto, 1998). Por ello podrían ser las responsables resultados obtenidos con el uso de antagonistas de GABA. Sin embargo el uso del antimitótico AraC no provoca cambios en los resultados obtenidos cuando se bloquean los receptores de GABA, lo que sugiere que los efectos observados no son mediados por la glía.

Las células gliales cumplen diversas funciones en relación con la **angiotensina** en el cerebro. Dado que los astrocitos presentan receptores AT₂, estos podrían regular indirectamente el efecto que la AII tiene sobre las células DAérgicas o sus precursores mediante la producción de factores tróficos que afectarían a la proliferación, supervivencia o inducción de estas células (ver más adelante 5.8- PROCESOS ONTOGENÉTICOS INVOLUCRADOS EN LOS EFECTOS OBSERVADOS: PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y APOPTOSIS). Además los astrocitos son capaces de sintetizar angiotensinógeno, el precursor de la angiotensina, y son la principal fuente de este polipéptido en cultivo (Holownia y Braszko, 2007; Intebi et al., 1990; Sernia, 1995; Thomas et al., 1992). El tratamiento con AraC no evitó el aumento en el número de células TH-ir obtenidas en cultivo, lo que sugiere que los astrocitos no están implicados en el efecto de la AII en la obtención de células DAérgicas y apoya la idea de que la cantidad de angiotensina sintetizada en cultivo no tiene efectos significativos sobre el desarrollo de estas células (ver 5.5- PRESENCIA DE LA SEÑAL EN EL CULTIVO).

El papel de las células gliales en la señalización mediada por **Shh** no fue investigado en este trabajo. Sin embargo hay que destacar que debido a su posición durante el desarrollo se ha sugerido que las células DAérgicas derivan de células de tipo glial en la placa basal que expresan Shh, favoreciendo su proliferación y supervivencia y que la señalización posterior determinará que adopten el fenotipo neural (Ang, 2006; Ho y Scott, 2002).

5.7.2- OTRAS POBLACIONES NEURONALES: CÉLULAS SEROTONINÉRGICAS Y GABAÉRGICAS

No sólo las células gliales son capaces de regular el desarrollo y diferenciación de las células DAérgicas. Otras poblaciones neuronales en cultivo podrían afectar a su desarrollo. Estudios previos ya habían descrito la interacción entre dos tipos neuronales distintos, de forma que controlan respectivamente su número durante el desarrollo, siendo las neuronas en diferenciación capaces de regular el número de células progenitoras en su entorno (Calof et al., 1998; Calver et al., 1998; Sommer, 2001; van Heyningen, Calver y Richardson, 2001). Los neurotransmisores podrían ser los encargados de regular de esta forma el tamaño de las distintas poblaciones.

La localización de los receptores de **serotonina** 5-HT₄ y 5-HT₇ en células gliales y serotoninérgicas obtenidas en cultivo de neuroesferas mesencefálicas apunta a estas poblaciones neurales como las mediadoras del efecto de la serotonina en las células DAérgicas. El receptor 5-HT₇ ha sido localizado anteriormente en los núcleos del rafe donde se encuentran situadas las células serotoninérgicas (Duncan, Short y Wheeler, 1999; Ruat et al., 1993; To et al., 1995). La expresión del receptor en precursores serotoninérgico inmortalizados en diferenciación sugiere que pudiera tener alguna función en el desarrollo de estas células. Observamos la presencia de receptores de tipo 5-HT₄ y 5-HT₇ en células que expresan TPH en nuestros cultivos, lo que sugiere que el fenotipo serotoninérgico podría ser potenciado por la activación de la AC en células serotoninérgicas (Galter y Unsicker, 2000; Rumajogee et al., 2004). La serotonina parece autoregular el desarrollo de neuronas 5-HTérgicas en cultivos celulares de E14 e iniciar y auto amplificar su propia síntesis en cultivos de hipotálamo (Whitaker-Azmitia et al., 1996). Por otra parte se ha observado que en mutantes para los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} el número de neuronas serotoninérgicas obtenidas en cultivos primarios de rafe era mayor (Rumajogee et al., 2004). Este aumento en el número de células serotoninérgicas podría ser responsable del descenso en el número de células DAérgicas obtenidas tras el tratamiento con GR127935,

antagonista de receptores 5-HT_{1B/1D}. Estudios más precisos son necesarios para aclarar el efecto que los receptores presentes en células serotoninérgicas tienen sobre la diferenciación de precursores mesencefálicos.

Dado que las células serotoninérgicas presentan receptores de **GABA** (Wirtshafter y Sheppard, 2001) y que la bicuculina afecta a la supervivencia de células serotoninérgicas en cultivos primarios de tronco cerebral (Liu et al., 1997), el efecto de este antagonista en el incremento de neuronas DAérgicas podría ser debido a la eliminación o reducción de las neuronas serotoninérgicas. Sin embargo en nuestros cultivos el tratamiento con antagonistas para receptores GABA_A o GABA_B durante la semana de diferenciación no afectó al número de células serotoninérgicas obtenidas a partir de neurosféricas.

Otra posibilidad es que el efecto mediado por los receptores no afecte tanto al número de neuronas serotoninérgicas que se diferencian sino a la síntesis y liberación de la serotonina misma. Se ha observado que el GABA a través de receptores GABA_A o GABA_B disminuye la liberación de 5-HT en cultivos primarios de células serotoninérgicas del romboencéfalo (Becquet et al., 1993), lo que podría explicar los resultados obtenidos con los antagonistas empleados. Sin embargo hemos mostrado como el efecto de la serotonina presente en el medio en nuestros cultivos es mediado principalmente por los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇ localizados en células gliales. Si el efecto fuera debido a la regulación de la liberación de serotonina esperaríamos que fuera inhibido al reducir la población glial con el antimitótico AraC, por el papel que estas células tienen en la diferenciación de células DAérgicas regulada por serotonina. Sin embargo los efectos que tienen los antagonistas de GABA sobre la generación de células DAérgicas en nuestros cultivos no se ven afectados por el tratamiento con AraC.

La localización de receptores de GABA en neuronas TH-ir y el que los resultados obtenidos con los antagonistas de receptores de GABA no muestran un cambio en la población serotoninérgica ni se ven modificados cuando el número de células gliales se ve reducido sugiere que el efecto del GABA en la diferenciación de neuronas DAérgicas es directo sobre sus precursores.

Las células GABAérgicas y serotoninérgicas fueron de interés en los efectos que la **angiotensina** tiene en la diferenciación de células DAérgicas descrita en estos estudios, por la relación anteriormente descrita que estas poblaciones tienen en la obtención de células DAérgicas. Sin embargo no observamos cambio en el tamaño de estas poblaciones diferenciadas en cultivos de precursores mesencefálicos en respuesta al tratamiento con AII.

Shh podría actuar como factor trófico para promover la supervivencia tanto de neuronas DAérgicas como 5-HTérgicas (Kholodilov et al., 2004; Miao et al., 1997; Tsuboi y Shults, 2002). Se ha sugerido que durante el desarrollo las células podrían competir por los factores neurotróficos disponibles, tal y como se ha observado en distintas poblaciones, incluyendo las DAérgicas (Kholodilov et al., 2004; Sommer, 2001; Sommer, 2006; van Heyningen, Calver y Richardson, 2001). En este contexto las células con un aporte trófico mayor de Shh por parte de las células productoras serían menos vulnerables que otras cuyo aporte de Shh sea menor. Se ha observado que en células en cultivo Shh se presenta asociado a las membranas celulares. Dado que Shh en nuestros cultivos se origina en la parte central del agregado celular, las células más próximas a este centro se verían menos afectadas que otras más periféricas en caso de un bloqueo incompleto mediante anti-Shh. De este modo las células DAérgicas se verían favorecidas frente a las 5-HTérgicas por su localización más central. Además el Ptc expresado por las células DAérgicas podría captar e impedir la difusión de Shh a células más alejadas de su lugar de origen (Chen y Struhl, 1996; Chen et al., 2004), reduciendo el soporte trófico de las células 5-HTérgicas, situadas exteriormente en la neurosfera. La Hip (del inglés hedgehog interacting protein) es una proteína que antagoniza las señales mediadas por Shh. Al igual que Ptc también es capaz de retener a Shh y regular su difusión, hallándose los dominios de expresión de Shh y Hip adyacentes en numerosos tejidos (Chuang y McMahon, 1999; Jeong y McMahon, 2005; Litingtung y Chiang, 2000). El descenso en la población serotoninérgica favorecería el incremento en la generación de neuronas DAérgicas observado cuando añadimos el anticuerpo anti-Shh. El descenso en el número de células GABAérgicas no ha podido ser demostrado como la causa de este efecto, ya

que los estudios que realizamos con antagonistas de receptores GABA no relacionan el descenso en la señalización de ambos receptores con un incremento en el número de células DAérgicas.

5.8- PROCESOS ONTOGENÉTICOS INVOLUCRADOS EN LOS EFECTOS OBSERVADOS: PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y APOPTOSIS.

La proliferación, diferenciación y apoptosis de los progenitores neurales y células postmitóticas son procesos fundamentales durante el desarrollo, responsables de generar el número correcto de células de cada tipo en el orden correcto para cada región cerebral (Cameron, Hazel y McKay, 1998). La **proliferación** es un proceso básico en el desarrollo, generando a partir de una única célula mediante divisiones sucesivas el suficiente número de células para generar un organismo completo. Depende del número de células capaces de dividirse, su tasa de replicación y el porcentaje de células hijas que salen del ciclo celular para convertirse en células postmitóticas. En la **diferenciación** intervienen tanto factores intracelulares como extracelulares que determinan tanto el momento en que las células abandonan el ciclo celular para convertirse en postmitóticas como el fenotipo que van a adquirir. La **apoptosis** o muerte celular programada es un proceso fisiológico natural que ocurre durante la embriogénesis y en el mantenimiento de los tejidos en el adulto. Se encarga de limitar el número de células que se forman, de la remodelación de numerosos tejidos y de eliminar aquellas células que resultaron dañadas sin provocar la inflamación en el tejido circundante que suele acompañar a la necrosis.

En el desarrollo del sistema nervioso se ha observado que los neurotransmisores pueden regular estos y otros procesos del desarrollo ontogenético, siendo especialmente interesantes aquellos casos en los que una población neuronal regula el desarrollo de otras que se desarrollan posteriormente.

5.8.1- SEROTONINA

La **serotonina** puede regular la proliferación, diferenciación y apoptosis en distintas poblaciones neuronales, siendo especialmente llamativa la capacidad de regular el desarrollo de nuevas células serotoninérgicas (Azmitia, 2001). La serotonina podría tener algún papel en la proliferación o supervivencia de las células en nuestros cultivos regulando de esta forma el número de células obtenidas tras la diferenciación. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, el bloqueo de la síntesis de serotonina o la reducción en la población serotoninérgica presente en cultivo no produjo efectos en la proliferación o apoptosis de células DAérgicas. Otros estudios muestran que receptores concretos podrían actuar en alguno de estos procesos (Seuwen y Pouyssegur, 1990). Así, se ha descrito actividad mitogénica asociada a la familia de receptores 5-HT₂ (Choi et al., 1997), o a la reducción en el contenido de AMPc celular (Fanburg y Lee, 1997), lo que podría explicar los cambios en el número de células TH-ir obtenidas tras el tratamiento con ritanserina o los antagonistas de receptores 5-HT_{1B/1D}, 5-HT₄ y 5-HT₇. Sin embargo resultados previos en nuestro laboratorio en concordancia con los de otros grupos sugieren que la 5-HT favorece la diferenciación (Whitaker-Azmitia et al., 1996).

5.8.2- GABA

El efecto que el bloqueo de receptores de **GABA** tiene en estos procesos ontogenéticos fue analizado en estos experimentos. En nuestros cultivos el tratamiento con antagonistas de receptores de GABA no afecta al número de células DAérgicas supervivientes (estudiado mediante marcaje con Hoechst o TUNEL) ni a la proliferación de precursores (marcaje con BrdU) obtenidos a partir de neurosféricas en proliferación. El GABA ha sido relacionado con la regulación de la proliferación neuronal (Fiszman, Borodinsky y Neale, 1999; Haydar et al., 2000; Nguyen et al., 2003; Owens y Kriegstein, 2002a; Owens y Kriegstein, 2002b), en aspectos de la diferenciación neuronal como la ramificación, el crecimiento neurítico, la maduración o la migración y la sinaptogénesis (Guillemot, 2007; Represa y Ben-Ari, 2005). El GABA puede favorecer la

supervivencia de neuronas 5-HT- y TH-ir en cultivo al tiempo que las GABA-ir se ven favorecidas por su bloqueo (Liu et al., 1997), favorecer su supervivencia sin afectar a la proliferación in vivo (Luk y Sadikot, 2001), favorecer la proliferación sin afectar a la supervivencia (Fisman, Borodinsky y Neale, 1999) o inhibir la proliferación sin afectar a la supervivencia (Nguyen et al., 2003). Estos estudios señalan a que el GABA puede tener distintos efectos en la proliferación y apoptosis no solo en distintas poblaciones neuronales en las mismas condiciones sino también variar en función del microambiente en el que se desarrollen.

Esto nos sugiere que las diferencias en el número de células TH-ir obtenidas en cultivo tras el tratamiento con los antagonistas de receptores GABA son debidas a un aumento en la diferenciación hacia el fenotipo DAérgico. Otros artículos mostraron que el GABA actúa regulando la diferenciación y maduración neuronal en cultivo (Jelitai et al., 2004; Owens y Kriegstein, 2002a; Owens y Kriegstein, 2002b). Aunque los mecanismos que median el efecto del GABA en la diferenciación no han sido aclarados, los resultados mostrados en nuestros experimentos como en los de otros laboratorios con antagonistas sugieren que son mediados por receptores GABAérgicos, y no por otros mecanismos en los que el GABA pudiera estar involucrado.

5.8-3- ANGIOTENSINA II

De igual modo se estudió si los efectos mediados por la **angiotensina** en el incremento de neuronas TH-ir eran debidos a una mayor proliferación o a una menor tasa de muerte celular. Los receptores AT₂ han sido relacionados tanto con efectos neuroprotectores frente a la apoptosis en neuronas (Grammatopoulos et al., 2002; Grammatopoulos et al., 2005) como con la estimulación de ésta (Shenoy et al., 1999; von Bohlen und Halbach y Albrecht, 2006). También los receptores tipo AT₁ han mostrado diversos efectos en la regulación de la apoptosis en neuronas DAérgicas (Grammatopoulos et al., 2007; Rey et al., 2007; Wilms et al., 2005). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que el incremento de células TH-ir obtenidas a partir de precursores no es debido a una mayor supervivencia frente a muerte celular apoptótica. No pudimos observar un

aumento en el número de células apoptóticas entre cultivos tratados con All y los no tratados, así como tampoco en el número de células DAérgicas apoptóticas. Dado que el incremento en el número de células obtenidas al cabo de una semana de diferenciación puede ser debido a la menor degeneración de neuronas DAérgicas o de sus precursores antes de pasados los siete días, comprobamos que tampoco había diferencias tras dos días de tratamiento.

Debido a esto el mayor número de células DAérgicas generadas debía atribuirse a una mayor proliferación de los progenitores de estas células o a una mayor diferenciación hacia el fenotipo DAérgico en los precursores que obtenemos tras la fase de proliferación. Estudios en diferentes tejidos sugieren que los receptores tipo AT₁ y AT₂ tienen acciones contrapuestas en la regulación del crecimiento (AbdAlla et al., 2001; Stoll y Unger, 2001). Así se ha sugerido que el crecimiento celular y la proliferación vienen mediados por los receptores AT₁ mientras que los tipo AT₂ inhiben este crecimiento al estimular la diferenciación (Gallinat et al., 2000; Gendron, Payet y Gallo-Payet, 2003; de Gasparo y Siragy, 1999). Incluso se ha observado que la señalización mediada por el AT₁ es capaz de reducir la expresión del receptor AT₂ (Saito et al., 2008). Para analizar si era debido a una mayor proliferación de los progenitores presentes en el cultivo cuando se añade la All se realizaron estudios mediante marcaje con BrdU, con el agente antimetabólico AraC y de medición del volumen de las neuroesferas. Basándonos en los datos obtenidos no podemos atribuir el incremento en el número de células DAérgicas obtenidas a una mayor proliferación en los cultivos tratados que en los no tratados. Ello nos sugiere que el aumento en el número de células DAérgicas obtenidas tras el tratamiento de precursores mesencefálicos con All es debido a la inducción de su diferenciación hacia este fenotipo. Se ha observado que en la línea celular PC12 la estimulación de estos receptores favorece la salida del ciclo celular y entrada en diferenciación, y el crecimiento y maduración de estas células en cultivo (Meffert et al., 1996). Se ha demostrado que la estimulación de los AT₂ induce la expresión de MMS2, proteína relacionada con la degradación proteosomal, que evita el daño celular y favorece la diferenciación neuronal (Li et al.,

2007; Mogi et al., 2006).

5.8.4- SONIC HEDGEHOG

Shh es una molécula encargada de la especificación del territorio ventral estableciendo un patrón de desarrollo en el tubo nervioso (Wilson y Maden, 2005). Shh no sólo se ocupa de la especificación de las estirpes celulares ventrales (incluidas las células DAérgicas mesencefálicas) en el sistema nervioso en desarrollo; también se ha demostrado su actividad mitogénica durante el desarrollo del sistema nervioso y en células troncales/progenitoras en cultivo (Britto, Tannahill y Keynes, 2002; Cai, Thorne y Grabel, 2008; Kenney y Rowitch, 2000; Palma et al., 2005; Palma et al., 2005; Williams et al., 2000). Además favorece la supervivencia de neuronas postmitóticas in vivo e in vitro (Britto, Tannahill y Keynes, 2000; Cai, Thorne y Grabel, 2008; Miao et al., 1997; Rafuse et al., 2005; Yurek et al., 2001). La regulación de proliferación, diferenciación y supervivencia por parte de Shh podría explicar el descenso en el número de neuronas GABAérgicas y 5-HTérgicas obtenidas en cultivo. Sin embargo el descenso en el número de células TH-ir es difícilmente explicable, y en este efecto podrían estar envueltos diferentes mecanismos. Se ha sugerido que Shh es necesario para la especificación temprana (E7.75-E9 en ratón) del fenotipo DAérgico y 5-HTérgico durante un corto periodo de tiempo (Ye et al., 1998; Zervas et al., 2004). Esto permite a Shh actuar sobre células que posteriormente estarán más alejadas de los centros de inducción. La expresión posterior podría regular la supervivencia celular, la guía axonal, la especificación en el territorio dorsal y el tamaño celular, entre otras (Bayly et al., 2007). Durante la diferenciación tardía de las neuronas DAérgicas Shh no se ha mostrado necesario (Hynes et al., 1995a; Wang et al., 1995) o incluso afecta negativamente (Sakurada et al., 1999). En otras células postmitóticas, sin embargo, la señalización mediada por Shh podría ser requerida para la correcta diferenciación (Ericson et al., 1996).

Distintos compuestos se han mostrado efectivos en la potenciación de la generación de neuronas DAérgicas a partir de sus precursores (Riaz y Bradford, 2005). En experimentos realizados en nuestro laboratorio obtuvimos incrementos en el número de células del 300-400% sobre los controles con los antioxidantes dipiridamol y N-acetilcisteína (Rodríguez-Pallares et al., 2001; Rodríguez-Pallares et al., 2002). El uso de citoquinas en el medio de diferenciación indujo aumentos de entre el 150% y el 350% (Ling et al., 1998; Potter, Ling y Carvey, 1999; Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-Garcia, 2005). También los neurotransmisores se han mostrado efectivos a la hora de regular la diferenciación de las neuronas DAérgicas a partir de sus precursores. La DA es capaz de regular la generación de neuronas DAérgica, especialmente cuando es utilizada en combinación con otras sustancias que favorecen la diferenciación neuronal y DAérgica, donde actúan de manera sinérgica para promover este fenotipo (Du y Iacovitti, 1995; Potter, Ling y Carvey, 1999; Riaz y Bradford, 2005; Riaz et al., 2002; Riaz et al., 2004; Zhou y Iacovitti, 2000; Zhou, Bradford y Stern, 1996). El tratamiento con DA o con factores de crecimiento como el BDNF o el GDNF por si solos no favorece la generación de neuronas DAérgicas más allá del 160% respecto a controles no tratados (Riaz et al., 2002, Riaz et al., 2004). El antagonista de receptores GABA_A bicuculina produjo por si solo incrementos de un 160% en el número de neuronas DAérgicas comparado con controles no tratados, que aunque inferiores a los obtenidos con citoquinas o antioxidantes esta en el rango de otros neurotransmisores. Antagonistas de receptores de la serotonina como la metiotepina, el SB269970 y el GR113808 permiten la obtención de más del doble de células TH-ir obtenidas en cultivo que controles no tratados, mientras que con All y el anticuerpo anti-Shh 5E1 permitieron obtener más del triple. Es posible que tratamientos que combinen factores de crecimiento o diferenciación bien conocidos y la regulación de la señalización mediada por las moléculas estudiadas a lo largo de esta tesis sean capaces de inducir una diferenciación más eficiente aún a partir de células progenitoras o troncales, útiles y necesarias para trasplantes en la terapia regenerativa de la EP (Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-Garcia, 2005).

5.9- IMPLANTES DE PRECURSORES MESENCEFÁLICOS EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Las células DAérgicas pueden ser generadas in vitro de muy diversas formas, tal y como muestran estos estudios y otros en distintos laboratorios y con distintas metodologías. A pesar de que distintos protocolos han logrado obtener neuronas DAérgicas in vitro, muchas de las células que se obtienen en cultivo no son capaces de sobrevivir y producir mejoría una vez trasplantadas (Arenas, 2002; Hudson et al., 1994; Kim et al., 2003; Zuddas et al., 1991). Las características que estas células deben reunir para que puedan producir una mejoría clínica tras su implante son (Lindvall y Bjorklund, 2004):

1. Las células deben secretar DA de forma controlada y mostrar las propiedades moleculares, morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas de la SN para tener un patrón común con las células que degeneraron.
2. Deben de ser capaces de mejorar el comportamiento motor en modelos animales de la EP.
3. La cantidad de células obtenidas debe de ser suficientemente alta como para poder sobrevivir en número suficiente una vez realizado el implante.
4. Las células implantadas deben de establecer una densa área de reinervación alrededor del trasplante en áreas extensas del estriado.
5. Los implantes deben de integrarse funcionalmente en los circuitos neuronales del hospedador.

Las propiedades de las neuronas DAérgicas una vez trasplantadas dependen en gran medida de las células de las que derivan. Diversos estudios realizados en modelos animales de la EP sugieren que son aquellas derivadas del mesencéfalo ventral las únicas neuronas DAérgicas capaces de reparar de forma exitosa la degeneración de la vía mesoestriatal (Abeliovich y Hammond, 2007; Arenas, 2002; Kim et al., 2003; Kim, 2007; Takahashi, 2007).

De entre los distintos protocolos empleados para incrementar la generación de neuronas DAérgicas en nuestro laboratorio a partir de precursores, el tratamiento con FGF-4 es de los más

exitosos. Estudios realizados en el desarrollo del sistema nervioso mostraron que Shh y FGF-8 inducen la formación de neuronas DAérgicas en el mesencéfalo ventral, mientras que si esta señalización es precedida por FGF-4 se inducen neuronas 5-HTérgicas (Hynes et al., 1995b; Ye et al., 1998). El tratamiento con anticuerpos anti-FGF-4 reduce la cantidad de neuronas 5-HTérgicas derivadas de precursores mesencefálicos al tiempo que favorece la generación de neuronas DAérgicas, tal y como ha sido demostrado en nuestro laboratorio en estudios previos (Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-Garcia, 2003).

En el presente estudio las células DAérgicas en suspensión obtenidas del cultivo de precursores mesencefálicos tratadas con anti-FGF-4 fueron trasplantadas al estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA. Las neuronas DAérgicas generadas fueron capaces de sobrevivir tiempo después de ser trasplantadas y reinervar el estriado circundante. En aquellas ratas en las que se indujo respuesta funcional el número de células TH-ir halladas fue semejante al número obtenido en implantes de tejido fetal. Esto sugiere que el tratamiento con anti-FGF-4 sobre precursores neurales mesencefálicos en diferenciación no afecta negativamente a su funcionalidad tras el trasplante. Sin embargo el volumen del implante fue mucho menor y la densidad de células DAérgicas en el implante mayor que en implantes de tejido fetal del presente y anteriores estudios con tejido fetal primario (Brundin et al., 1988; Lopez-Martin et al., 1999a; Muñoz et al., 2003b). El menor volumen de estos implantes tiene la ventaja de que provocaría daños menores en el estriado implantado, y permite hacer múltiples implantes, lo cual se ha mostrado que incrementa la mejoría funcional (Goren et al., 2005; Nikkhah et al., 1995; Ramachandran, Bartlett y Mendez, 2002). Además el uso de suspensiones celulares permite una mayor supervivencia que implantes de tejido sólido, y una mejor integración y conectividad con el tejido del hospedador con menor rechazo (Mendez et al., 2005). Los implantes contenían células DAérgicas que eran capaces de inervar el estriado circundante y producir mejora en pruebas de comportamiento rotacional inducida por anfetamina. Los mecanismos que controlan la distribución de las células una vez implantadas no son bien conocidos. Se ha observado que cuando se implantan células en suspensión éstas se reorganizan

durante el periodo de maduración del implante. Cuando se hacen implantes con células en suspensión procedentes de las eminencias ganglionares se organizan en áreas o parches de neuronas estriatales y áreas de neuronas no estriatales (Labandeira-Garcia et al., 1991; Liste et al., 1997). Si la suspensión es de células estriatales y mesencefálicas fetales, una vez desarrollado el implante las células DAérgicas se concentran en las áreas de neuronas estriatales (Lopez-Martin et al., 1999b). Si el implante es exclusivamente de células derivadas del mesencéfalo en desarrollo, las células DAérgicas se disponen en la periferia del trasplante mientras que el interior está ocupado por células no TH-ir (Bjorklund et al., 2002; Kordower et al., 1996; Mounir et al., 1994). En cultivo, las células DAérgicas en agregados celulares procedentes de la diferenciación a partir de precursores mesencefálicos aparecen en o próximas al núcleo central de células FP4+, como vimos anteriormente. Posteriormente se dispondrán en la periferia del agregado, formando una capa de células que rodea el área central (Rodriguez-Pallares, Guerra y Labandeira-Garcia, 2003). A diferencia de lo observado en implantes de tejido mesencefálico fetal o la distribución que las células en cultivo adoptan, los implantes de células mesencefálicas en suspensión presentan células TH-ir incluso en el centro de los implantes. Estas diferencias pueden ser debidas a la diferente composición de células que están presentes en los implantes al mismo tiempo que las células DAérgicas. El estudio de la reorganización de las células en implantes procedentes de precursores en suspensión requiere una aproximación metodológica distinta de la empleada en estos estudios.

El éxito de las células trasplantadas en la terapia de la EP depende en gran medida de su capacidad de reinervar el tejido estriatal e integrarse funcionalmente. Tal y como se observó en este y anteriores estudios con tejido primario fetal (Cenci et al., 1992; Cenci, Campbell y Bjorklund, 1993; Lopez-Martin et al., 1999a), los implantes obtenidos a partir de precursores proliferados en cultivo son capaces de reinervar el estriado e inducir respuestas funcionales en las neuronas estriatales del animal trasplantado. De entre las aproximaciones experimentales empleadas para demostrar los efectos de la lesión de la vía mesoestriatal y su posible recuperación son bien

conocidas aquellas que evalúan el comportamiento rotacional y la expresión de Fos inducidas por anfetamina (Cenci y Bjorklund, 1994; Cenci et al., 1992; Dunnett et al., 1981; Ungerstedt y Arbuthnott, 1970). La anfetamina afecta a la transmisión DA inhibiendo la recaptación de DA y provocando su liberación en las terminales DAérgicas y la expresión de Fos en células estriatales. Si se lesiona unilateralmente un animal de experimentación la expresión de Fos deja de ocurrir en el estriado denervado y se provoca un comportamiento asimétrico de rotación hacia el lado denervado (rotación ipsiversiva). Las células DAérgicas obtenidas a partir de precursores mesencefálicos liberan DA en respuesta a anfetamina y provocan la expresión de Fos en neuronas estriatales postsinápticas. Esto demuestra que estas células son capaces de integrarse en el estriado del huésped, y además de establecer interacciones funcionales con aferencias corticales necesarias para la expresión de Fos en el estriado como se observó previamente con tejido fetal primario (Cenci y Bjorklund, 1994; Muñoz et al., 2003a; Muñoz et al., 2003b). La integración funcional también es evidenciada por la reducción en la rotación ipsiversiva inducida por anfetamina observada en este trabajo.

Como ya hemos comentado los métodos empleados para la generación de células DAérgicas provocan la generación de células 5-HTérgicas (Alenina, Bashammakh y Bader, 2006; Bjorklund et al., 2002; Bjorklund et al., 2002; Kim et al., 2002; Lee et al., 2000; Studer, Tabar y McKay, 1998). Es por ello que no es extraño encontrar células 5-HTérgicas en implantes derivados de tejido mesencefálico en este y otros estudios (Carlsson et al., 2006; Carlsson et al., 2007; Mounir et al., 1994; Muñoz et al., 2003b). El tratamiento con anticuerpo anti-FGF-4 en cultivos de neuroesferas de precursores mesencefálicos indujo un incremento en el número de células DAérgicas y un descenso en el número de células 5-HTérgicas (Rodríguez-Pallares, Guerra y Labandeira-Garcia, 2003). De modo similar, el número de células 5-HTérgicas en los implantes derivados de cultivos tratados es significativamente menor que en aquellos derivados de tejido fetal. Este aumento sin embargo no parece afectar a la funcionalidad de los implantes, aun cuando se ha sugerido que la presencia de células 5-HT podría ser beneficiosa para la liberación de DA (Bjorklund et al., 2002,

De Deurwaerdere et al., 1996). El número de células 5-HTérgicas en implantes derivados de precursores proliferados in vitro es menor que en aquellos procedentes de tejido primario fetal. Estas células 5-HTérgicas poseen el enzima AADC, responsable de descarboxilar la L-DOPA administrada a pacientes para paliar los síntomas motores asociados con la EP (Lopez et al., 2001; Lopez-Real et al., 2003). La síntesis de DA a partir de L-DOPA por parte de células 5-HTérgicas ha sido relacionada con la aparición de disquinesias: sólo las células catecolaminérgicas son capaces de regular la liberación y recaptación de DA, por lo que la síntesis por parte de otras poblaciones neurales provoca bruscas oscilaciones en la disponibilidad de DA, causando la aparición de disquinesias. Se ha mostrado que la presencia de las células DAérgicas en los implantes evita la aparición de estos movimientos involuntarios debido a su capacidad de amortiguar estos cambios (Carlsson et al., 2007; Carta et al., 2007). Además estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que las terminales DAérgicas procedentes del implante son capaces de establecer conexiones con terminales 5-HTérgicas presentes en el estriado lesionado, regulando su función (Muñoz et al., 2003a). La relación entre el número de células DAérgicas y 5-HTérgicas en implantes de tejido fetal es aproximadamente dos células DAérgicas por cada una 5-HTérgica. En aquellos animales trasplantados con precursores en los que no se observó recuperación funcional la relación entre el número de neuronas DAérgicas y el de 5-HTérgicas en el implante es aproximadamente el mismo, pero mucho menor que en aquellos implantes que lograban la recuperación (cinco células DAérgicas por cada 5-HTérgica). La baja relación entre el número de células DAérgicas y el de 5-HTérgicas en aquellos animales que no lograron recuperación funcional puede atribuirse a la mayor vulnerabilidad de las células DAérgicas en comparación con las 5-HTérgicas durante el proceso del trasplante.

Resultados muy similares a los obtenidos mediante el uso de precursores tratados con el anticuerpo FGF-4 fueron obtenidos posteriormente en otro laboratorio al comparar cultivos procedentes del mesencéfalo en los que el número de precursores 5-HTérgicos vino determinado por la propia técnica de disección del mesencéfalo ventral (Carlsson et al., 2007).

CONCLUSIONES

6- CONCLUSIONES

1. La inhibición de receptores gliales de serotonina tipo 5-HT₄ y 5-HT₇ aumentan la generación de neuronas dopaminérgicas en neurosféricas de precursores mesencefálicos
2. El GABA presente en cultivos de neurosféricas obtenidas a partir de progenitores mesencefálicos regula la generación de neuronas dopaminérgicas.
3. La generación de neuronas dopaminérgicas en cultivo se ve favorecida por el bloqueo de receptores GABA_A presentes en sus precursores, mientras que el bloqueo de receptores GABA_B reduce el número de neuronas dopaminérgicas que se diferencian.
4. La angiotensina favorece la diferenciación de progenitores mesencefálicos hacia el fenotipo DAérgico por medio de receptores AT₂ presentes en los propios progenitores.
5. Sonic hedgehog afecta a la proliferación, supervivencia y diferenciación de los progenitores mesencefálicos obtenidos en etapas tardías de desarrollo, regulando el número de células dopaminérgicas en cultivo.
6. La ruta de señalización canónica de Sonic hedgehog no es la única que interviene en los procesos ontogenéticos de las neuronas dopaminérgicas.
7. Neuronas dopaminérgicas generadas a partir de progenitores proliferados y diferenciados en cultivo son capaces de sobrevivir tras su implante en el estriado de animales de experimentación, integrarse anatómicamente y tener efectos funcionales sobre el hospedador.

8. El tratamiento de los precursores dopaminérgicos con anticuerpo anti-FGF4 no afecta negativamente a la supervivencia e integración de las células una vez implantadas.

BIBLIOGRAFÍA

7- BIBLIOGRAFÍA

- AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U (2001) The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 276:39721-39726.
- Abeliovich A, Hammond R (2007) Midbrain dopamine neuron differentiation: Factors and fates. *Developmental Biology*, 304:447-454.
- Alavian KN, Scholz C, Simon HH (2008) Transcriptional regulation of mesencephalic dopaminergic neurons: The full circle of life and death. *Movement Disorders* 23:319-328.
- Alberio R, Campbell KH, Johnson AD (2006) Reprogramming somatic cells into stem cells. *Reproduction* 132:709-720.
- Alenina N, Bashammakh S, Bader M (2006) Specification and differentiation of serotonergic neurons. *Stem Cell Rev* 2:5-10.
- Allen AM, MacGregor DP, Chai SY, Donnan GA, Kaczmarczyk S, Richardson K, Kalnins R, Ireton J, Mendelsohn FA (1992) Angiotensin II receptor binding associated with nigrostriatal dopaminergic neurons in human basal ganglia. *Ann Neurol* 32:339-344.
- Ang SL (2006) Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* 133:3499-3506.
- Arenas E (2002) Stem cells in the treatment of parkinson's disease. *Brain Res Bull* 57:795-808.
- Azmitia EC (2001) Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin*, 56:413-424.
- Babior BM (2004) NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16:42-47.
- Babior BM (1999) NADPH oxidase: An update. *Blood* 93:1464-1476.
- Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 21:1200-1207.
- Barbin G, Pollard H, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1993) Involvement of GABAA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 152:150-154.
- Barker JL, Behar T, Li YX, Liu QY, Ma W, Maric D, Maric I, Schaffner AE, Serafini R, Smith SV, Somogyi R, Vautrin JY, Wen XL, Xian H (1998) GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect Dev Neurobiol* 5:305-322.
- Barlow BK, Cory-Slechta DA, Richfield EK, Thiruchelvam M (2007) The gestational environment and parkinson's disease: Evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. *Reproductive Toxicology*, 23:457-470.

- Basu B, Desai R, Balaji J, Chaerkady R, Sriram V, Maiti S, Panicker M (2008) Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential. *Reproduction* .
- Bayly RD, Ngo M, Aglyamova GV, Agarwala S (2007) Regulation of ventral midbrain patterning by hedgehog signaling. *Development* 134:2115-2124.
- Becquet D, Hery M, Francois-Bellan AM, Giraud P, Deprez P, Faudon M, Fache MP, Hery F (1993) Glutamate, GABA, glycine and taurine modulate serotonin synthesis and release in rostral and caudal rhombencephalic raphe cells in primary cultures. *Neurochem Int* 23:269-283.
- Beique JC, Chapin-Penick EM, Mladenovic L, Andrade R (2004) Serotonergic facilitation of synaptic activity in the developing rat prefrontal cortex. *J Physiol* 556:739-754.
- Benabid AL (2003) Deep brain stimulation for parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 13:696-706.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: The nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.
- Benner EJ, Mosley RL, Destache CJ, Lewis TB, Jackson-Lewis V, Gorantla S, Nemachek C, Green SR, Przedborski S, Gendelman HE (2004) Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:9435-9440.
- Berninger B, Guillemot F, Gotz M (2007) Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. *Eur J Neurosci* 25:2581-2590.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.
- Bjorklund A, Dunnett SB, Brundin P, Stoessl AJ, Freed CR, Breeze RE, Levivier M, Peschanski M, Studer L, Barker R (2003) Neural transplantation for the treatment of parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2:437-445.
- Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2344-2349.
- Bonaventure P, Guo H, Tian B, Liu X, Bittner A, Roland B, Salunga R, Ma XJ, Kamme F, Meurers B, Bakker M, Jurzak M, Leysen JE, Erlander MG (2002) Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Res* 943:38-47.
- Bonuccelli U, Del Dotto P (2006) New pharmacologic horizons in the treatment of parkinson disease. *Neurology* 67:S30-8.
- Borta A, Hoglinger GU (2007) Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem* 100:587-595.

- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005) Toxin-induced models of parkinson's disease. *NeuroRx* 2:484-494.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121-134.
- Britto J, Tannahill D, Keynes R (2002) A critical role for sonic hedgehog signaling in the early expansion of the developing brain. *Nat Neurosci* 5:103-110.
- Britto JM, Tannahill D, Keynes RJ (2000) Life, death and sonic hedgehog. *Bioessays* 22:499-502.
- Brown DC, Steward LJ, Ge J, Barnes NM (1996) Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 118:414-420.
- Brundin P, Barbin G, Strecker RE, Isacson O, Prochiantz A, Bjorklund A (1988) Survival and function of dissociated rat dopamine neurones grafted at different developmental stages or after being cultured in vitro. *Brain Res* 467:233-243.
- Burbach JPH, Smidt MP (2006) Molecular programming of stem cells into mesodiencephalic dopaminergic neurons. *Trends in Neurosciences*, 29:601-603.
- Bureau M, Laschet J, Bureau-Heeren M, Hennuy B, Minet A, Wins P, Grisar T (1995) Astroglial cells express large amounts of GABAA receptor proteins in mature brain. *J Neurochem* 65:2006-2015.
- Buznikov GA, Lambert HW, Lauder JM (2001) Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res* 305:177-186.
- Cai C, Thorne J, Grabel L (2008) Hedgehog serves as a mitogen and survival factor during embryonic stem cell neurogenesis. *Stem Cells* .
- Calof AL, Mumm JS, Rim PC, Shou J (1998) The neuronal stem cell of the olfactory epithelium. *J Neurobiol* 36:190-205.
- Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (1998) Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 20:869-882.
- Cameron HA, Hazel TG, McKay RD (1998) Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol* 36:287-306.
- Campos LS (2004) Neurospheres: Insights into neural stem cell biology. *J Neurosci Res* 78:761-769.
- Carlsson T, Carta M, Winkler C, Bjorklund A, Kirik D (2007) Serotonin neuron transplants exacerbate L-DOPA- induced dyskinesias in a rat model of parkinson's disease. *J Neurosci* 27:8011-8022.
- Carlsson T, Winkler C, Lundblad M, Cenci MA, Björklund A, Kirik D (2006) Graft placement and uneven pattern of reinnervation in the striatum is important for development of graft-induced dyskinesia. *Neurobiology of Disease*, 21:657-668.

- Carson MJ, Thomas EA, Danielson PE, Sutcliffe JG (1996) The 5HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: A mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia* 17:317-326.
- Carta M, Carlsson T, Kirik D, Bjorklund A (2007) Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain* 130:1819-1833.
- Carvey PM, Punati A, Newman MB (2006) Progressive dopamine neuron loss in parkinson's disease: The multiple hit hypothesis. *Cell Transplant* 15:239-250.
- Cenci MA, Bjorklund A (1994) Transection of corticostriatal afferents abolishes the hyperexpression of fos and counteracts the development of rotational overcompensation induced by intrastriatal dopamine-rich grafts when challenged with amphetamine. *Brain Res* 665:167-174.
- Cenci MA, Campbell K, Bjorklund A (1993) Neuropeptide messenger RNA expression in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat striatum reinnervated by fetal dopaminergic transplants: Differential effects of the grafts on preproenkephalin, preprotachykinin and prodynorphin messenger RNA levels. *Neuroscience* 57:275-296.
- Cenci MA, Kalen P, Mandel RJ, Wictorin K, Bjorklund A (1992) Dopaminergic transplants normalize amphetamine- and apomorphine-induced fos expression in the 6-hydroxydopamine-lesioned striatum. *Neuroscience* 46:943-957.
- Charles KJ, Deuchars J, Davies CH, Pangalos MN (2003) GABA B receptor subunit expression in glia. *Mol Cell Neurosci* 24:214-223.
- Chen MH, Li YJ, Kawakami T, Xu SM, Chuang PT (2004) Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* 18:641-659.
- Chen Y, Struhl G (1996) Dual roles for patched in sequestering and transducing hedgehog. *Cell* 87:553-563.
- Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L (1997) 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* 124:1745-1755.
- Chuang PT, McMahon AP (1999) Vertebrate hedgehog signalling modulated by induction of a hedgehog-binding protein. *Nature* 397:617-621.
- Colombo E, Giannelli SG, Galli R, Tagliafico E, Foroni C, Tenedini E, Ferrari S, Ferrari S, Corte G, Vescovi A, Cossu G, Broccoli V (2006) Embryonic stem-derived versus somatic neural stem cells: A comparative analysis of their developmental potential and molecular phenotype. *Stem Cells* 24:825-834.
- Cote F, Do TH, Laflamme L, Gallo JM, Gallo-Payet N (1999) Activation of the AT₂ receptor of angiotensin II induces neurite outgrowth and cell migration in microexplant cultures of the cerebellum. *J Biol Chem* 274:31686-31692.

- Dawson T, Mandir A, Lee M (2002) Animal models of PD: Pieces of the same puzzle? *Neuron* 35:219-222.
- Dawson TM (2005) Failures and successes of clinical trials for parkinson disease treatments. *Retina* 25:S75-S77.
- De Deurwaerdere P, Bonhomme N, Lucas G, Le Moal M, Spampinato U (1996) Serotonin enhances striatal dopamine outflow in vivo through dopamine uptake sites. *J Neurochem* 66:210-215.
- de Gasparo M, Siragy HM (1999) The AT₂ receptor: Fact, fancy and fantasy. *Regul Pept* 81:11-24.
- Dellovade T, Romer JT, Curran T, Rubin LL (2006) The hedgehog pathway and neurological disorders. *Annu Rev Neurosci* 29:539-563.
- DeLong MR, Wichmann T (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64:20-24.
- Dessaud E, Yang LL, Hill K, Cox B, Ulloa F, Ribeiro A, Mynett A, Novitsch BG, Briscoe J (2007) Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450:717-720.
- Dick FD (2006) Parkinson's disease and pesticide exposures. *Br Med Bull* 79-80:219-231.
- Du X, Iacovitti L (1995) Synergy between growth factors and transmitters required for catecholamine differentiation in brain neurons. *J Neurosci* 15:5420-5427.
- Duncan MJ, Short J, Wheeler DL (1999) Comparison of the effects of aging on 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors in discrete regions of the circadian timing system in hamsters. *Brain Res* 829:39-45.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Lindvall O (2001) Cell therapy in parkinson's disease - stop or go? *Nat Rev Neurosci* 2:365-369.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Stenevi U, Iversen SD (1981) Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. unilateral lesions. *Brain Res* 215:147-161.
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM (1996) Two critical periods of sonic hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87:661-673.
- Esposito E, Di Matteo V, Di Giovanni G (2007) Death in the substantia nigra: A motor tragedy. *Expert Rev Neurother* 7:677-697.
- Evans JR, Barker RA (2008) Neurotrophic factors as a therapeutic target for parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets* 12:437-447.
- Fan CM, Porter JA, Chiang C, Chang DT, Beachy PA, Tessier-Lavigne M (1995) Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: Direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway. *Cell* 81:457-465.

- Fanburg BL, Lee SL (1997) A new role for an old molecule: Serotonin as a mitogen. *Am J Physiol* 272:L795-806.
- Fecteau KA, Eiler H (2001) Placenta detachment: Unexpected high concentrations of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in fetal blood and its mitogenic effect on placental cells in bovine. *Placenta* 22:103-110.
- Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, Dempsey PK, Fischman AJ, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J, Isacson O (2000) Porcine xenografts in parkinson's disease and huntington's disease patients: Preliminary results. *Cell Transplant* 9:273-278.
- Fiszman ML, Borodinsky LN, Neale JH (1999) GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 115:1-8.
- Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF (2005) Genetic mouse models of parkinsonism: Strengths and limitations. *NeuroRx* 2:495-503.
- Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA (1994) Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11:83-93.
- Fukui M, Nakamichi N, Yoneyama M, Ozawa S, Fujimori S, Takahata Y, Nakamura N, Taniura H, Yoneda Y (2008) Modulation of cellular proliferation and differentiation through GABA(B) receptors expressed by undifferentiated neural progenitor cells isolated from fetal mouse brain. *J Cell Physiol* 216:507-19
- Fuller RW (1995) Serotonin uptake inhibitors: Uses in clinical therapy and in laboratory research. *Prog Drug Res* 45:167-204.
- Gallinat S, Busche S, Raizada MK, Sumners C (2000) The angiotensin II type 2 receptor: An enigma with multiple variations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E357-74.
- Gallinat S, Yu M, Dorst A, Unger T, Herdegen T (1998) Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT2 and AT1 receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Brain Res Mol Brain Res* 57:111-122.
- Galter D, Unsicker K (2000) Sequential activation of the 5-HT1(A) serotonin receptor and TrkB induces the serotonergic neuronal phenotype. *Mol Cell Neurosci* 15:446-455.
- Galter D, Bottner M, Krieglstein K, Schomig E, Unsicker K (1999) Differential regulation of distinct phenotypic features of serotonergic neurons by bone morphogenetic proteins. *Eur J Neurosci* 11:2444-2452.
- Galzin AM, Poirier MF, Lista A, Chodkiewicz JP, Blier P, Ramdine R, Loo H, Roux FX, Redondo A, Langer SZ (1992) Characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor modulating the release of 5-[3H]hydroxytryptamine in slices of the human neocortex. *J Neurochem* 59:1293-1301.
- Gandhi S, Wood NW (2005) Molecular pathogenesis of parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14:2749-2755.

- Ge J, Barnes NM (1996) Alterations in angiotensin AT1 and AT2 receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 297:299-306.
- Gelband CH, Zhu M, Lu D, Reagan LP, Fluharty SJ, Posner P, Raizada MK, Sumners C (1997) Functional interactions between neuronal AT1 and AT2 receptors. *Endocrinology* 138:2195-2198.
- Gendron L, Payet M, Gallo-Payet N (2003) The angiotensin type 2 receptor of angiotensin II and neuronal differentiation: From observations to mechanisms. *J Mol Endocrinol* 31:359-372.
- Gendron L, Cote F, Payet MD, Gallo-Payet N (2002) Nitric oxide and cyclic GMP are involved in angiotensin II AT(2) receptor effects on neurite outgrowth in NG108-15 cells. *Neuroendocrinology* 75:70-81.
- Goren B, Kahveci N, Eyigor O, Alkan T, Korfali E, Ozluk K (2005) Effects of intranigral vs intrastriatal fetal mesencephalic neural grafts on motor behavior disorders in a rat parkinson model. *Surg Neurol* 64 Suppl 2:S33-41.
- Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE (1991) Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88:921-933.
- Grammatopoulos T, Morris K, Ferguson P, Weyhenmeyer J (2002) Angiotensin protects cortical neurons from hypoxic-induced apoptosis via the angiotensin type 2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 99:114-124.
- Grammatopoulos TN, Outeiro TF, Hyman BT, Standaert DG (2007) Angiotensin II protects against alpha-synuclein toxicity and reduces protein aggregation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 363:846-851.
- Grammatopoulos TN, Ahmadi F, Jones SM, Fariss MW, Weyhenmeyer JA, Zawada WM (2005) Angiotensin II protects cultured midbrain dopaminergic neurons against rotenone-induced cell death. *Brain Res* 1045:64-71.
- Grammatopoulos TN, Jones SM, Ahmadi FA, Hoover BR, Snell LD, Skoch J, Jhaveri VV, Poczobutt AM, Weyhenmeyer JA, Zawada WM (2007) Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Mol Neurodegener* 2:1.
- Guillemot F (2007) Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Progress in Neurobiology*, 83:37-52.
- Guo H, Tang Z, Yu Y, Xu L, Jin G, Zhou J (2002) Apomorphine induces trophic factors that support fetal rat mesencephalic dopaminergic neurons in cultures. *Eur J Neurosci* 16:1861-1870.
- Gupta A, Dawson TM (2007) The role of stem cells in parkinson's disease. *Neurosurg Clin N Am* 18:129-42, x-xi.
- Hagg T (2005) Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: An integrated view. *Trends in Neurosciences*, 28:589-595.

- Hall AC, Mira H, Wagner J, Arenas E (2003) Region-specific effects of glia on neuronal induction and differentiation with a focus on dopaminergic neurons. *Glia* 43:47-51.
- Hansson SR, Mezey E, Hoffman BJ (1998) Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: Early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-serotonergic neurons. *Neuroscience* 83:1185-1201.
- Hauser RA, Zesiewicz TA (2007) Advances in the pharmacologic management of early parkinson disease. *Neurologist* 13:126-132.
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2007) Parkinson's disease: A dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:599-614.
- Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 20:5764-5774.
- Herrera AJ, Castano A, Venero JL, Cano J, Machado A (2000) The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis* 7:429-447.
- Hery F, Boulenguez P, Semont A, Hery M, Becquet D, Faudon M, Deprez P, Fache MP (1999) Identification and role of serotonin 5-HT1A and 5-HT1B receptors in primary cultures of rat embryonic rostral raphe nucleus neurons. *J Neurochem* 72:1791-1801.
- Hirst WD, Price GW, Rattray M, Wilkin GP (1997) Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br J Pharmacol* 120:509-515.
- Hirst WD, Cheung NY, Rattray M, Price GW, Wilkin GP (1998) Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT1 receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res Mol Brain Res* 61:90-99.
- Ho KS, Scott MP (2002) Sonic hedgehog in the nervous system: Functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 12:57-63.
- Hodaie M, Neimat JS, Lozano AM (2007) The dopaminergic nigrostriatal system and parkinson's disease: Molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. *Neurosurgery* 60:17-28; discussion 28-30.
- Holownia A, Braszko J (2007) The effect of angiotensin II and IV on ERK1/2 and CREB signalling in cultured rat astroglial cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 376:157-163.
- Horiuchi M, Hayashida W, Akishita M, Yamada S, Lehtonen JY, Tamura K, Daviet L, Chen YE, Hamai M, Cui TX, Iwai M, Minokoshi Y (2000) Interferon-gamma induces AT(2) receptor expression in fibroblasts by Jak/STAT pathway and interferon regulatory factor-1. *Circ Res* 86:233-240.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533-554.

- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203.
- Huang XC, Richards EM, Sumners C (1996) Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J Biol Chem* 271:15635-15641.
- Hudson JL, Bickford P, Johansson M, Hoffer BJ, Stromberg I (1994) Target and neurotransmitter specificity of fetal central nervous system transplants: Importance for functional reinnervation. *J Neurosci* 14:283-290.
- Hynes M, Rosenthal A (1999) Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Current Opinion in Neurobiology*, 9:26-36.
- Hynes M, Poulsen K, Tessier-Lavigne M, Rosenthal A (1995a) Control of neuronal diversity by the floor plate: Contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell*, 80:95-101.
- Hynes M, Porter JA, Chiang C, Chang D, Tessier-Lavigne M, Beachy PA, Rosenthal A (1995b) Induction of midbrain dopaminergic neurons by sonic hedgehog. *Neuron*, 15:35-44.
- Ichiki T, Inagami T (1995) Expression, genomic organization, and transcription of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene. *Circ Res* 76:693-700.
- Inagami T, Senbonmatsu T (2001) Dual effects of angiotensin II type 2 receptor on cardiovascular hypertrophy. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 11:324-328.
- Intebi AD, Flaxman MS, Ganong WF, Deschepper CF (1990) Angiotensinogen production by rat astroglial cells in vitro and in vivo. *Neuroscience* 34:545-554.
- Jackson ZE, Stringer BM, Foster GA (1997) Identification of 5-HT receptor sub-types in a homogeneous population of presumptive serotonergic neurones. *Neuropharmacology* 36:543-548.
- Jelítai M, Anderova M, Marko K, Kekesi K, Koncz P, Sykova E, Madarasz E (2004) Role of gamma-aminobutyric acid in early neuronal development: Studies with an embryonic neuroectodermal stem cell clone. *J Neurosci Res* 76:801-811.
- Jenkins D, Winyard PJ, Woolf AS (2007) Immunohistochemical analysis of sonic hedgehog signalling in normal human urinary tract development. *J Anat* 211:620-629.
- Jenkins TA, Mendelsohn FA, Chai SY (1997) Angiotensin-converting enzyme modulates dopamine turnover in the striatum. *J Neurochem* 68:1304-1311.
- Jensen P, Bauer M, Jensen CH, Widmer HR, Gramsbergen JB, Blaabjerg M, Zimmer J, Meyer M (2007) Expansion and characterization of ventral mesencephalic precursor cells: Effect of mitogens and investigation of FA1 as a potential dopaminergic marker. *J Neurosci Res* 85:1884-1893.

- Jeong J, McMahon AP (2005) Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development* 132:143-154.
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkuhler J (1998) Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281:419-424.
- Jow F, Chiu D, Lim HK, Novak T, Lin S (2004) Production of GABA by cultured hippocampal glial cells. *Neurochem Int* 45:273-283.
- Kambayashi Y, Nagata K, Ichiki T, Inagami T (1996) Insulin and insulin-like growth factors induce expression of angiotensin type-2 receptor in vascular-smooth-muscle cells. *Eur J Biochem* 239:558-565.
- Kawasaki H, Mizuseki K, Sasai Y (2002) Selective neural induction from ES cells by stromal cell-derived inducing activity and its potential therapeutic application in parkinson's disease. *Methods Mol Biol* 185:217-227.
- Kenney AM, Rowitch DH (2000) Sonic hedgehog promotes G1 cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol* 20:9055-9067.
- Kettenmann H, Schachner M (1985) Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *J Neurosci* 5:3295-3301.
- Kholodilov N, Yarygina O, Oo TF, Zhang H, Sulzer D, Dauer W, Burke RE (2004) Regulation of the development of mesencephalic dopaminergic systems by the selective expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in their targets. *J Neurosci* 24:3136-3146.
- Kim HT, Kim IS, Lee IS, Lee JP, Snyder EY, Park KI (2006) Human neurospheres derived from the fetal central nervous system are regionally and temporally specified but are not committed. *Exp Neurol* 199:222-235.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of parkinson's disease. *Nature* 418:50-56.
- Kim JY, Koh HC, Lee JY, Chang MY, Kim YC, Chung HY, Son H, Lee YS, Studer L, McKay R, Lee SH (2003) Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* 85:1443-1454.
- Kim KM, Nakajima S, Nakajima Y (1997) Dopamine and GABA receptors in cultured substantia nigra neurons: Correlation of electrophysiology and immunocytochemistry. *Neuroscience* 78:759-769.
- Kim SU (2007) Genetically engineered human neural stem cells for brain repair in neurological diseases. *Brain Dev* 29:193-201.
- Klawans HL, Stein RW, Tanner CM, Goetz CG (1982) A pure parkinsonian syndrome following acute carbon monoxide intoxication. *Arch Neurol* 39:302-304.

- Kochen W, Kohlmuller D, De Biasi P, Ramsay R (2003) The endogeneous formation of highly chlorinated tetrahydro-beta-carbolines as a possible causative mechanism in idiopathic parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol* 527:253-263.
- Kordower JH, Rosenstein JM, Collier TJ, Burke MA, Chen EY, Li JM, Martel L, Levey AE, Mufson EJ, Freeman TB, Olanow CW (1996) Functional fetal nigral grafts in a patient with parkinson's disease: Chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J Comp Neurol* 370:203-230.
- Krobert KA, Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Levy FO (2001) The cloned human 5-HT7 receptor splice variants: A comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:620-632.
- Kruger R, Eberhardt O, Riess O, Schulz JB (2002) Parkinson's disease: One biochemical pathway to fit all genes? *Trends Mol Med* 8:236-240.
- Kwon IS, Park RH, Choi JM, Kim SU, Lee YD, Suh-Kim H (2006) Differential regulation of tyrosine hydroxylase expression by sonic hedgehog. *Neuroreport* 17:693-698.
- Labandeira-Garcia JL, Wictorin K, Cunningham ET,Jr, Bjorklund A (1991) Development of intrastriatal striatal grafts and their afferent innervation from the host. *Neuroscience* 42:407-426.
- Laflamme L, Gasparo Md, Gallo J, Payet MD, Gallo-Payet N (1996) Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG108-15 cells. EFFECT COUNTERACTED BY THE AT1 RECEPTORS. *J Biol Chem* 271:22729-22735.
- Lambert HW, Lauder JM (1999) Serotonin receptor agonists that increase cyclic AMP positively regulate IGF-I in mouse mandibular mesenchymal cells. *Dev Neurosci* 21:105-112.
- Lang AE (2007) The progression of parkinson disease: A hypothesis. *Neurology* 68:948-952.
- Lang AE (2000) Surgery for parkinson disease: A critical evaluation of the state of the art. *Arch Neurol* 57:1118-1125.
- Lara J, Kusano K, House S, Gainer H (2003) Interactions of cyclic adenosine monophosphate, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor treatment on the survival and growth of postnatal mesencephalic dopamine neurons in vitro. *Exp Neurol* 180:32-45.
- Lauder JM (1993) Neurotransmitters as growth regulatory signals: Role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* 16:233-240.
- Lauder JM (1990) Ontogeny of the serotonergic system in the rat: Serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci* 600:297-313; discussion 314.
- Lauder JM, Liu J, Devaud L, Morrow AL (1998) GABA as a trophic factor for developing monoamine neurons. *Perspect Dev Neurobiol* 5:247-259.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD (2000) Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18:675-679.

- Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y, Khazipov R (1999) GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv Neurol* 79:189-201.
- Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ (1995) Intrastratial implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of parkinson's disease. *J Neurosci* 15:7810-7820.
- Li A, Guo H, Luo X, Sheng J, Yang S, Yin Y, Zhou J, Zhou J (2006) Apomorphine-induced activation of dopamine receptors modulates FGF-2 expression in astrocytic cultures and promotes survival of dopaminergic neurons. *FASEB J* 20:1263-1265.
- Li J, Mogi M, Tsukuda K, Tomochika H, Iwanami J, Min L, Nahmias C, Iwai M, Horiuchi M (2007) Angiotensin II-induced neural differentiation via angiotensin II type 2 (AT2) receptor-MMS2 cascade involving interaction between AT2 receptor-interacting protein and src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 1. *Mol Endocrinol* 21:499-511.
- Li SP, Lee HY, Park MS, Bahk JY, Chung BC, Kim MO (2006) Prenatal GABAB1 and GABAB2 receptors: Cellular and subcellular organelle localization in early fetal rat cortical neurons. *Synapse* 60:557-566.
- Lindvall O (2003) Stem cells for cell therapy in parkinson's disease. *Pharmacol Res* 47:279-287.
- Lindvall O, Bjorklund A (2004) Cell therapy in parkinson's disease. *NeuroRx* 1:382-393.
- Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM (1998) Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol* 149:411-423.
- Liste I, Caruncho HJ, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (1997) GABA(A) receptor subunit expression in intrastratial striatal grafts comparison between normal developing striatum and developing striatal grafts. *Brain Res Dev Brain Res* 103:185-194.
- Litingtung Y, Chiang C (2000) Control of shh activity and signaling in the neural tube. *Dev Dyn* 219:143-154.
- Liu B (2006) Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of parkinson's disease. *AAPS J* 8:E606-21.
- Liu B, Gao HM, Hong JS (2003) Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: Role of neuroinflammation. *Environ Health Perspect* 111:1065-1073.
- Liu J, Lauder JM (1992) Serotonin promotes region-specific glial influences on cultured serotonin and dopamine neurons. *Glia* 5:306-317.
- Liu JP, Lauder JM (1991) Serotonin and nialamide differentially regulate survival and growth of cultured serotonin and catecholamine neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 62:297-305.

- Liu J, Morrow AL, Devaud L, Grayson DR, Lauder JM (1997) GABAA receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro. *J Neurosci* 17:2420-2428.
- Lopez A, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2001) Mechanisms of the effects of exogenous levodopa on the dopamine-denervated striatum. *Neuroscience* 103:639-651.
- Lopez-Martin E, Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (1999a) Recovery after nigral grafting in 6-hydroxydopamine lesioned rats is due to graft function and not significantly influenced by the remaining ipsilateral or contralateral host dopaminergic system. *Brain Res* 842:119-131.
- Lopez-Martin E, Caruncho HJ, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (1999b) Striatal dopaminergic afferents concentrate in GDNF-positive patches during development and in developing intrastriatal striatal grafts. *J Comp Neurol* 406:199-206.
- Lopez-Real A, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2003) Localization and functional significance of striatal neurons immunoreactive to aromatic L-amino acid decarboxylase or tyrosine hydroxylase in rat parkinsonian models. *Brain Res* 969:135-146.
- Lopez-Real A, Rey P, Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Labandeira-Garcia JL (2005) Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of parkinsonism. *J Neurosci Res* 81:865-873.
- Loric S, Maroteaux L, Kellermann O, Launay JM (1995) Functional serotonin-2B receptors are expressed by a teratocarcinoma-derived cell line during serotonergic differentiation. *Mol Pharmacol* 47:458-466.
- Lotharius J, Brundin P (2002) Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 11:2395-2407.
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T (1998) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 188:661-670.
- Luk KC, Sadikot AF (2001) GABA promotes survival but not proliferation of parvalbumin-immunoreactive interneurons in rodent neostriatum: An in vivo study with stereology. *Neuroscience* 104:93-103.
- Lynn-Bullock CP, Welshhans K, Pallas SL, Katz PS (2004) The effect of oral 5-HTP administration on 5-HTP and 5-HT immunoreactivity in monoaminergic brain regions of rats. *J Chem Neuroanat* 27:129-138.
- Marti E, Bovolenta P (2002) Sonic hedgehog in CNS development: One signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* 25:89-96.
- Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games D, Schenk D (2005) Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of parkinson's disease. *Neuron* 46:857-868.

- Matsutani S, Yamamoto N (1998) GABAergic neuron-to-astrocyte signaling regulates dendritic branching in coculture. *J Neurobiol* 37:251-264.
- Matsutani S, Yamamoto N (1997) Neuronal regulation of astrocyte morphology in vitro is mediated by GABAergic signaling. *Glia* 20:1-9.
- Mattson MP (2007) Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6:337-350.
- Maxwell SL, Li M (2005) Midbrain dopaminergic development in vivo and in vitro from embryonic stem cells. *J Anat* 207:209-218.
- Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T (1996) The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol* 122:59-67.
- Mendez I, Sanchez-Pernaute R, Cooper O, Vinuela A, Ferrari D, Bjorklund L, Dagher A, Isacson O (2005) Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with parkinson's disease. *Brain* 128:1498-1510.
- Miao N, Wang M, Ott JA, D'Alessandro JS, Woolf TM, Bumcrot DA, Mahanthappa NK, Pang K (1997) Sonic hedgehog promotes the survival of specific CNS neuron populations and protects these cells from toxic insult in vitro. *J Neurosci* 17:5891-5899.
- Michel PP, Agid Y (1996) Chronic activation of the cyclic AMP signaling pathway promotes development and long-term survival of mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurochem* 67:1633-1642.
- Millan MA, Jacobowitz DM, Aguilera G, Catt KJ (1991) Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11440-11444.
- Moeller I, Small DH, Reed G, Harding JW, Mendelsohn FA, Chai SY (1996) Angiotensin IV inhibits neurite outgrowth in cultured embryonic chicken sympathetic neurones. *Brain Res* 725:61-66.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T (1999) Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in parkinson's disease. *Neurosci Lett* 270:45-48.
- Mogi M, Li J, Iwanami J, Min L, Tsukuda K, Iwai M, Horiuchi M (2006) Angiotensin II type-2 receptor stimulation prevents neural damage by transcriptional activation of methyl methanesulfonate sensitive 2. *Hypertension* 48:141-148.
- Mouillet-Richard S, Mutel V, Loric S, Tournois C, Launay JM, Kellermann O (2000) Regulation by neurotransmitter receptors of serotonergic or catecholaminergic neuronal cell differentiation. *J Biol Chem* 275:9186-9192.
- Mounir A, Chkirate M, Vallee A, Pierret P, Geffard M, Doucet G (1994) Host serotonin axons innervate intrastriatal ventral mesencephalic grafts after implantation in newborn rats. *Eur J Neurosci* 6:1307-1315.

- Muñoz A, Lopez-Real A, Labandeira-Garcia JL, Guerra MJ (2003a) Interaction between the noradrenergic and serotonergic systems in locomotor hyperactivity and striatal expression of fos induced by amphetamine in rats. *Exp Brain Res* 153:92-99.
- Muñoz A, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2003b) Host brain regulation of dopaminergic grafts function: Role of the serotonergic and noradrenergic systems in amphetamine-induced responses. *Synapse* 47:66-76.
- Muñoz AM, Rey P, Parga J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2005) Glial overexpression of heme oxygenase-1: A histochemical marker for early stages of striatal damage. *J Chem Neuroanat* 29:113-126.
- Muñoz AM, Rey P, Soto-Otero R, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2004) Systemic administration of N-acetylcysteine protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine-induced degeneration. *J Neurosci Res* 76:551-562.
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A (2000) Changes in cytokines and neurotrophins in parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* (60):277-290.
- Nguyen L, Malgrange B, Breuskin I, Bettendorff L, Moonen G, Belachew S, Rigo JM (2003) Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J Neurosci* 23:3278-3294.
- Nguyen L, Malgrange B, Belachew S, Rogister B, Rocher V, Moonen G, Rigo JM (2002) Functional glycine receptors are expressed by postnatal nestin-positive neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci* 15:1299-1305.
- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G (2001) Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* 305:187-202.
- Nikkhah G, Cunningham MG, McKay R, Bjorklund A (1995) Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. II. transplant-induced behavioral recovery. *J Neurosci* 15:3562-3570.
- Noda M, Higashida H, Aoki S, Wada K (2004) Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol Neurobiol* 29:31-39.
- Nuyt AM, Lenkei Z, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortes C (2001) Ontogeny of angiotensin II type 1 receptor mRNAs in fetal and neonatal rat brain. *J Comp Neurol* 440:192-203.
- Nuyt AM, Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C (1999) Ontogeny of angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain. *J Comp Neurol* 407:193-206.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Arbizu J, Gimenez-Amaya JM (2002) The basal ganglia and disorders of movement: Pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci* 17:51-55.

- O'Brien JA, Berger AJ (1999) Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 82:1638-1641.
- Obrietan K, van den Pol AN (1997) GABA activity mediating cytosolic Ca²⁺ rises in developing neurons is modulated by cAMP-dependent signal transduction. *J Neurosci* 17:4785-4799.
- Obrietan K, Gao XB, Van Den Pol AN (2002) Excitatory actions of GABA increase BDNF expression via a MAPK-CREB-dependent mechanism--a positive feedback circuit in developing neurons. *J Neurophysiol* 88:1005-1015.
- Ogata A, Tashiro K, Nukuzuma S, Nagashima K, Hall WW (1997) A rat model of parkinson's disease induced by japanese encephalitis virus. *J Neurovirol* 3:141-147.
- Olanow CW, Kordower JH, Freeman TB (1996) Fetal nigral transplantation as a therapy for parkinson's disease. *Trends Neurosci* 19:102-109.
- Ostenfeld T, Horn P, Aardal C, Orpen I, Caldwell MA, Svendsen CN (1999) Mouse epidermal growth factor-responsive neural precursor cells increase the survival and functional capacity of embryonic rat dopamine neurons in vitro. *Neuroreport* 10:1985-1992.
- Ostenfeld T, Joly E, Tai YT, Peters A, Caldwell M, Jauniaux E, Svendsen CN (2002) Regional specification of rodent and human neurospheres. *Brain Res Dev Brain Res* 134:43-55.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002a) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715-727.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002b) Developmental neurotransmitters? *Neuron* 36:989-991.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132:335-344.
- Pauwels PJ (2000) Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem Pharmacol* 60:1743-1750.
- Perrone-Capano C, Di Porzio U (2000) Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Int J Dev Biol* 44:679-687.
- Piccini P, Pavese N, Hagell P, Reimer J, Bjorklund A, Oertel WH, Quinn NP, Brooks DJ, Lindvall O (2005) Factors affecting the clinical outcome after neural transplantation in parkinson's disease. *Brain* 128:2977-2986.
- Placzek M, Briscoe J (2005) The floor plate: Multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* 6:230-240.
- Pliego Rivero FB, McCormack WJ, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF (1999) Forskolin-induced expression of tyrosine hydroxylase in human foetal brain cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 114:201-206.

- Potter ED, Ling ZD, Carvey PM (1999) Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons. *Cell Tissue Res* 296:235-246.
- Prakash N, Wurst W (2006a) Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 63:187-206.
- Prakash N, Wurst W (2006b) Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons. *J Physiol* 575:403-410.
- Przedborski S (2005) Pathogenesis of nigral cell death in parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11 Suppl 1:S3-7.
- Rafuse VF, Soundararajan P, Leopold C, Robertson HA (2005) Neuroprotective properties of cultured neural progenitor cells are associated with the production of sonic hedgehog. *Neuroscience* 131:899-916.
- Ramachandran AC, Bartlett LE, Mendez IM (2002) A multiple target neural transplantation strategy for parkinson's disease. *Rev Neurosci* 13:243-256.
- Rao SS, Hofmann LA, Shakil A (2006) Parkinson's disease: Diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 74:2046-2054.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 92:179-212.
- Reed G, Moeller I, Mendelsohn FA, Small DH (1996) A novel action of angiotensin peptides in inhibiting neurite outgrowth from isolated chick sympathetic neurons in culture. *Neurosci Lett* 210:209-212.
- Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T (2003) Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: Role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J* 17:2094-2096.
- Represa A, Ben-Ari Y (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 28:278-283.
- Rey P, Lopez-Real A, Sanchez-Iglesias S, Muñoz A, Soto-Otero R, Labandeira-Garcia JL (2007) Angiotensin type-1-receptor antagonists reduce 6-hydroxydopamine toxicity for dopaminergic neurons. *Neurobiol Aging* 28:555-567.
- Riaz SS, Bradford HF (2005) Factors involved in the determination of the neurotransmitter phenotype of developing neurons of the CNS: Applications in cell replacement treatment for parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 76:257-278.
- Riaz SS, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF (2002) The controlled conversion of human neural progenitor cells derived from foetal ventral mesencephalon into dopaminergic neurons in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 136:27-34.

- Riaz SS, Theofilopoulos S, Jauniaux E, Stern GM, Bradford HF (2004) The differentiation potential of human foetal neuronal progenitor cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 153:39-51.
- Riobo NA, Manning DR (2007) Pathways of signal transduction employed by vertebrate hedgehogs. *Biochem J* 403:369-379.
- Roberts C, Price GW, Middlemiss DN (2001) Ligands for the investigation of 5-HT autoreceptor function. *Brain Res Bull* 56:463-469.
- Rodriguez MC, Obeso JA, Olanow CW (1998) Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in parkinson's disease: A target for neuroprotection. *Ann Neurol* 44:S175-88.
- Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2005) Angiotensin II and interleukin-1 interact to increase generation of dopaminergic neurons from neurospheres of mesencephalic precursors. *Brain Res Dev Brain Res* 158:120-122.
- Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2003) Elimination of serotonergic cells induces a marked increase in generation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors. *Eur J Neurosci* 18:2166-2174.
- Rodriguez-Pallares J, Caruncho HJ, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2002) Dipyrindamole-induced increase in production of rat dopaminergic neurons from mesencephalic precursors. *Neurosci Lett* 320:65-68.
- Rodriguez-Pallares J, Rey P, Soto-Otero R, Labandeira-Garcia JL (2001) N-acetylcysteine enhances production of dopaminergic neurons from mesencephalic-derived precursor cells. *Neuroreport* 12:3935-3938.
- Rodriguez-Pallares J, Quiroz CR, Parga JA, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2004) Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *Eur J Neurosci* 20:1489-1498.
- Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2007) Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem* 103:145-156.
- Roussa E, Wiehle M, Dunker N, Becker-Katins S, Oehlke O, Krieglstein K (2006) Transforming growth factor beta is required for differentiation of mouse mesencephalic progenitors into dopaminergic neurons in vitro and in vivo: Ectopic induction in dorsal mesencephalon. *Stem Cells* 24:2120-2129.
- Roussa E, Krieglstein K (2004) Induction and specification of midbrain dopaminergic cells: Focus on SHH, FGF8, and TGF- β . *Cell Tissue Res* 318:23-33.
- Roybon L, Christophersen NS, Brundin P, Li JY (2004) Stem cell therapy for parkinson's disease: Where do we stand? *Cell Tissue Res* 318:261-273.

- Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC (1993) Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8547-8551.
- Rumajogee P, Verge D, Darmon M, Brisorgueil MJ, Hamon M, Miquel MC (2005) Rapid up-regulation of the neuronal serotonergic phenotype by brain-derived neurotrophic factor and cyclic adenosine monophosphate: Relations with raphe astrocytes. *J Neurosci Res* 81:481-487.
- Rumajogee P, Verge D, Hanoun N, Brisorgueil MJ, Hen R, Lesch KP, Hamon M, Miquel MC (2004) Adaption of the serotonergic neuronal phenotype in the absence of 5-HT autoreceptors or the 5-HT transporter: Involvement of BDNF and cAMP. *Eur J Neurosci* 19:937-944.
- Saavedra JM (2005) Brain angiotensin II: New developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol* 25:485-512.
- Saito M, Shinohara Y, Sasaki H, Netsu Y, Yoshida M, Nakahata N (2008) Type 1 angiotensin receptor (AT₁-R)-mediated decrease in type 2 angiotensin receptor mRNA level is dependent on gq and extracellular signal-regulated kinase 1//2 in AT₁-R-transfected PC12 cells. *J Neuroendocrinol* 20:299-308.
- Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, Gage FH (1999) Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 126:4017-4026.
- Sanchez B, Lopez-Martin E, Segura C, Labandeira-Garcia JL, Perez-Fernandez R (2002) 1,25-dihydroxyvitamin D(3) increases striatal GDNF mRNA and protein expression in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 108:143-146.
- Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM (2006) Diagnosis and treatment of parkinson disease: Molecules to medicine. *J Clin Invest* 116:1744-1754.
- Schapira AH, Olanow CW (2004) Neuroprotection in parkinson disease: Mysteries, myths, and misconceptions. *JAMA* 291:358-364.
- Schlesinger F, Meywirth J, Krampfl K, Grosskreutz J, Petri S, Mauth C, Just L, Bader A, Bufler J (2004) Ligand-gated channels in early mesencephalic neuronal precursors: Immunocytochemical and electrophysiological analysis. *Eur J Neurosci* 19:2371-2376.
- Schober A (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318:215-224.
- Sernia C (1995) Location and secretion of brain angiotensinogen. *Regul Pept* 57:1-18.
- Seuwen K, Pouyssegur J (1990) Serotonin as a growth factor. *Biochem Pharmacol* 39:985-990.
- Shacka JJ, Roth KA, Zhang J (2008) The autophagy-lysosomal degradation pathway: Role in neurodegenerative disease and therapy. *Front Biosci* 13:718-736.

- Shenoy UV, Richards EM, Huang XC, Sumners C (1999) Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. *Endocrinology* 140:500-509.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000) Familial parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25:302-305.
- Simola N, Morelli M, Carta AR (2007) The 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Neurotox Res* 11:151-167.
- Singec I, Jandial R, Crain A, Nikkhah G, Snyder EY (2007) The leading edge of stem cell therapeutics. *Annu Rev Med* 58:313-328.
- Singh C, Ahmad I, Kumar A (2007) Pesticides and metals induced parkinson's disease: Involvement of free radicals and oxidative stress. *Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand)* 53:19-28.
- Singh N, Pillay V, Choonara YE (2007) Advances in the treatment of parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 81:29-44.
- Smidt MP, Smits SM, Burbach JPH (2004) Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 318:35-43.
- Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD (2006) Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1477-1497.
- Sommer L (2006) Growth factors regulating neural crest cell fate decisions. *Adv Exp Med Biol* 589:197-205.
- Sommer L (2001) Context-dependent regulation of fate decisions in multipotent progenitor cells of the peripheral nervous system. *Cell Tissue Res* 305:211-216.
- Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Lopez-Real AM, Labandeira-Garcia JL (2002) Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: Relevance for parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 64:125-135.
- Speth RC, Karamyan VT (2008) Brain angiotensin receptors and binding proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* .
- Sprouse JS, Aghajanian GK (1987) Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists. *Synapse* 1:3-9.
- Steckelings UM, Kaschina E, Unger T (2005) The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* 26:1401-1409.
- Stoll M, Unger T (2001) Angiotensin and its AT2 receptor: New insights into an old system. *Regul Pept* 99:175-182.

- Storch A, Schwarz J (2002) Neural stem cells and neurodegeneration. *Curr Opin Investig Drugs* 3:774-781.
- Storch A, Sabolek M, Milosevic J, Schwarz SC, Schwarz J (2004) Midbrain-derived neural stem cells: From basic science to therapeutic approaches. *Cell Tissue Res* 318:15-22.
- Stringer BM, Verhofstad AA, Foster GA (1994) Raphe neural cells immortalized with a temperature-sensitive oncogene: Differentiation under basal conditions down an APUD cell lineage. *Brain Res Dev Brain Res* 79:267-274.
- Stroth U, Meffert S, Gallinat S, Unger T (1998) Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: Role of the AT2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 53:187-195.
- Studer L, Tabar V, McKay RD (1998) Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* 1:290-295.
- Stull ND, Iacovitti L (2001) Sonic hedgehog and FGF8: Inadequate signals for the differentiation of a dopamine phenotype in mouse and human neurons in culture. *Exp Neurol* 169:36-43.
- Stull ND, Iacovitti L (1996) Acidic fibroblast growth factor and catecholamines synergistically up-regulate tyrosine hydroxylase activity in developing and damaged dopamine neurons in culture. *J Neurochem* 67:1519-1524.
- Sulzer D (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in parkinson's disease. *Trends Neurosci* 30:244-250.
- Svendsen CN, Caldwell MA, Ostenfeld T (1999) Human neural stem cells: Isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol* 9:499-513.
- Svendsen CN, Clarke DJ, Rosser AE, Dunnett SB (1996) Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol* 137:376-388.
- Szabo G, Katarova Z, Greenspan R (1994) Distinct protein forms are produced from alternatively spliced bicistronic glutamic acid decarboxylase mRNAs during development. *Mol Cell Biol* 14:7535-7545.
- Szeto HH (2006) Mitochondria-targeted peptide antioxidants: Novel neuroprotective agents. *AAPS J* 8:E521-31.
- Takahashi J (2007) Stem cell therapy for parkinson's disease. *Expert Rev Neurother* 7:667-675.
- Takayama H, Ray J, Raymon HK, Baird A, Hogg J, Fisher LJ, Gage FH (1995) Basic fibroblast growth factor increases dopaminergic graft survival and function in a rat model of parkinson's disease. *Nat Med* 1:53-58.

- Testaz S, Jarov A, Williams KP, Ling LE, Koteliansky VE, Fournier-Thibault C, Duband JL (2001) Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the patched- smoothened-gli signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12521-12526.
- Thibert C, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM, Mehlen P (2003) Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* 301:843-846.
- Thomas B, Beal MF (2007) Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 16:R183-194.
- Thomas DR, Soffin EM, Roberts C, Kew JN, de la Flor RM, Dawson LA, Fry VA, Coggon SA, Faedo S, Hayes PD, Corbett DF, Davies CH, Hagan JJ (2006) SB-699551-A (3-cyclopentyl-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-N-[(4'-{[(2-phenylethyl)amino]methyl}-4-biphenyl)methyl]propanamide dihydrochloride), a novel 5-HT_{5A} receptor-selective antagonist, enhances 5-HT neuronal function: Evidence for an autoreceptor role for the 5-HT_{5A} receptor in guinea pig brain. *Neuropharmacology* 51:566-577.
- Thomas WG, Greenland KJ, Shinkel TA, Sernia C (1992) Angiotensinogen is secreted by pure rat neuronal cell cultures. *Brain Res* 588:191-200.
- Thompson L, Barraud P, Andersson E, Kirik D, Bjorklund A (2005) Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections. *J Neurosci* 25:6467-6477.
- To ZP, Bonhaus DW, Eglen RM, Jakeman LB (1995) Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. *Br J Pharmacol* 115:107-116.
- Trzaska KA, Rameshwar P (2007) Current advances in the treatment of parkinson's disease with stem cells. *Curr Neurovasc Res* 4:99-109.
- Tsuboi K, Shults CW (2002) Intrastriatal injection of sonic hedgehog reduces behavioral impairment in a rat model of parkinson's disease. *Exp Neurol* 173:95-104.
- Ugarte SD, Homanics GE, Hammond DL (2001) Effect of embryonic knock-down of GABA_A receptors on the levels of monoamines and their metabolites in the CNS of the mouse. *Brain Res* 904:290-297.
- Ungerstedt U (1968) 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5:107-110.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485-493.
- Uversky VN (2007) Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 103:17-37.
- van Heyningen P, Calver AR, Richardson WD (2001) Control of progenitor cell number by mitogen supply and demand. *Curr Biol* 11:232-241.

- Varju P, Katarova Z, Madarasz E, Szabo G (2001) GABA signalling during development: New data and old questions. *Cell Tissue Res* 305:239-246.
- Vitalis T, Cases O, Parnavelas JG (2005) Development of the dopaminergic neurons in the rodent brainstem. *Exp Neurol* 191 Suppl 1:S104-12.
- von Bohlen und Halbach, O., Albrecht D (2006) The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* 326:599-616.
- Vrana KE, Hipp JD, Goss AM, McCool BA, Riddle DR, Walker SJ, Wettstein PJ, Studer LP, Tabar V, Cunniff K, Chapman K, Vilner L, West MD, Grant KA, Cibelli JB (2003) Nonhuman primate parthenogenetic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1:11911-11916.
- Waeber C, Sebben M, Bockaert J, Dumuis A (1996) Regional distribution and ontogeny of 5-HT₄ binding sites in rat brain. *Behav Brain Res* 73:259-262.
- Wang MZ, Jin P, Bumcrot DA, Marigo V, McMahon AP, Wang EA, Woolf T, Pang K (1995) Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by sonic hedgehog protein. *Nat Med* 1:1184-1188.
- Whitaker-Azmitia PM, Druse M, Walker P, Lauder JM (1996) Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res* 73:19-29.
- Williams Z, Tse V, Hou L, Xu L, Silverberg GD (2000) Sonic hedgehog promotes proliferation and tyrosine hydroxylase induction of postnatal sympathetic cells in vitro. *Neuroreport* 11:3315-3319.
- Wilms H, Rosenstiel P, Unger T, Deuschl G, Lucius R (2005) Neuroprotection with angiotensin receptor antagonists: A review of the evidence and potential mechanisms. *Am J Cardiovasc Drugs* 5:245-253.
- Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R (2007) Inflammation in parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: Cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 13:1925-1928.
- Wilson L, Maden M (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282:1-13.
- Wirtshafter D, Sheppard AC (2001) Localization of GABA(B) receptors in midbrain monoamine containing neurons in the rat. *Brain Res Bull* 56:1-5.
- Yamamoto M, Steinbusch HW, Jessell TM (1981) Differentiated properties of identified serotonin neurons in dissociated cultures of embryonic rat brain stem. *J Cell Biol* 91:142-152.
- Yang H, Shaw G, Raizada MK (2002) ANG II stimulation of neuritogenesis involves protein kinase B in brain neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R107-14.
- Yasuhara T, Shingo T, Date I (2007) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy for parkinson's disease. *Acta Med Okayama* 61:51-56.

- Ye W, Shimamura K, Rubenstein JLR, Hynes MA, Rosenthal A (1998) FGF and shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*, 93:755-766.
- Young HE et al (2005) Adult-derived stem cells and their potential for use in tissue repair and molecular medicine. *J Cell Mol Med* 9:753-769.
- Yuan H, Zheng JC, Liu P, Zhang SF, Xu JY, Bai LM (2007) Pathogenesis of parkinson's disease: Oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. *Neurosci Bull* 23:125-130.
- Yurek DM, Fletcher-Turner A, Moore J, Chai L, Mahanthappa N (2001) Co-grafts of fetal ventral mesencephalon and fibroblasts expressing sonic hedgehog: Effect on survival and function of dopamine grafts. *Cell Transplant* 10:665-671.
- Zecca L, Zucca FA, Albertini A, Rizzio E, Fariello RG (2006) A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of parkinson's disease. *Neurology* 67:S8-11.
- Zervas M, Millet S, Ahn S, Joyner AL (2004) Cell behaviors and genetic lineages of the mesencephalon and rhombomere 1. *Neuron* 43:345-357.
- Zhang J, Lipinski R, Shaw A, Gipp J, Bushman W (2007) Lack of demonstrable autocrine hedgehog signaling in human prostate cancer cell lines. *J Urol* 177:1179-1185.
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645-660.
- Zhou FC, Lesch KP, Murphy DL (2002) Serotonin uptake into dopamine neurons via dopamine transporters: A compensatory alternative. *Brain Res* 942:109-119.
- Zhou FC, Sari Y, Zhang JK (2000) Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 119:33-45.
- Zhou J, Iacovitti L (2000) Mechanisms governing the differentiation of a serotonergic phenotype in culture. *Brain Res* 877:37-46.
- Zhou J, Bradford HF, Stern GM (1996) Induction of dopaminergic neurotransmitter phenotype in rat embryonic cerebrocortex by the synergistic action of neurotrophins and dopamine. *Eur J Neurosci* 8:2328-2339.
- Zuddas A, Corsini GU, Barker JL, Kopin IJ, Di Porzio U (1991) Specific reinnervation of lesioned mouse striatum by grafted mesencephalic dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 3:72-85.